

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-524319

(P2006-524319A)

(43) 公表日 平成18年10月26日(2006.10.26)

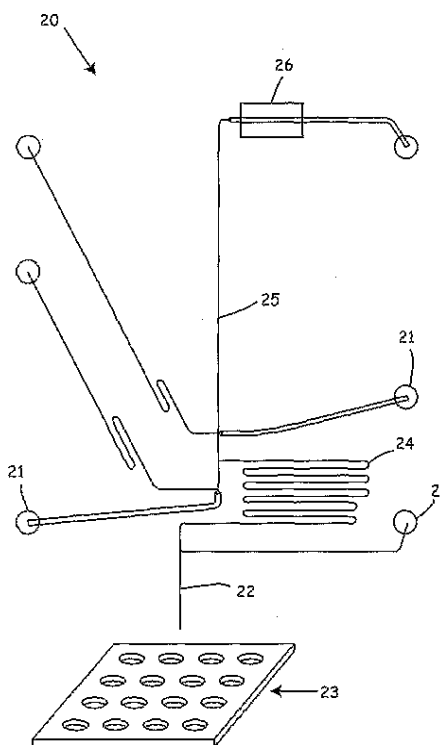
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/558 (2006.01)	GO 1 N 33/558	4 B O 6 3
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566 Z N A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 E	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 1 5 K	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-501260 (P2006-501260)	(71) 出願人	505359333 カリパー・ライフ・サイエンシズ・インク
(86) (22) 出願日	平成16年4月8日(2004.4.8)		
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月21日(2005.10.21)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/010914		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02004/092733		1 7 4 8 ホプキントン エルム ストリ
(87) 国際公開日	平成16年10月28日(2004.10.28)		ート 6 8
(31) 優先権主張番号	60/462, 636	(71) 出願人	505384427
(32) 優先日	平成15年4月14日(2003.4.14)		和光純薬工業株式会社
(33) 優先権主張国	米国 (US)		東京都中央区日本橋本町 2 丁目 1 - 7
(31) 優先権主張番号	60/500, 177	(74) 代理人	100064355
(32) 優先日	平成15年9月4日(2003.9.4)		弁理士 川原田 一穂
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	エイチ・ガレット・ワダ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
			0 2 7 アザートン ヴィクトリア ドラ
			イヴ 5 5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移動度シフトアッセイ干渉の低減

(57) 【要約】

本発明は例えば移動度シフトアッセイにおける非特異的結合サンプル成分の干渉を低減するための方法及び組成物を提供する。例えば成分をヘパリン硫酸等の荷電ポリマーと結合することにより、サンプル成分とアフィニティー物質（例えばアフィニティー分子又はアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート）の非特異的結合に起因する干渉を防止する。本発明は対象分析物を高濃度に濃縮し、分析物を高感度で検出し、更に分析物を容易に濃縮できるように反応条件を最適化するための方法も提供する。本発明のこのような目的は例えばサンプル中の分析物をDNA等の荷電キャリアー分子と結合したアフィニティー分子に接触させることにより形成される分析物とコンジュゲートとの複合体を濃縮することにより達成される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中の対象分析物の検出又は同定方法であって、

( i ) 分析物に対して親和性をもつ 1 個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させて分析物と 1 個以上のアフィニティー分子の複合体を形成する段階と；

( i i ) 約 0 . 1 ~ 5 0 0 ミクロンの少なくとも 1 個のマイクロスケール寸法をもつ少なくとも 1 個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルを使用することにより、荷電ポリマーの存在下に複合体と未結合アフィニティー分子を分離する段階と；

( i i i ) 複合体を検出して分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定する段階を含み、荷電ポリマーは検出妨害を低減するものである前記方法。 10

## 【請求項 2】

荷電ポリマーがポリアニオン性ポリマー又はポリカチオン性ポリマーである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

荷電ポリマーが多糖類、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、合成高分子化合物、セラミック及びそれらの複合体からなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

荷電ポリマーが、poly - d I d C、ヘパリン硫酸、デキストラン硫酸、ポリタングステン酸、ポリアネートルスルホン酸、ポリビニル硫酸、ポリアクリレート、コンドロイチン硫酸、プラスミド DNA、仔ウシ胸腺 DNA、サケ精子 DNA、セルロースに結合した DNA、ガラス粒子、コロイドガラス、及び乳白ガラスからなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 5】

荷電ポリマーが、ポリアリルアミン類、ポリリジン、ポリヒスチジン、キトサン、プロタミン、ポリエチレンジイミン及びポリアルギニンからなる群から選択されるポリカチオン性ポリマーである請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

荷電ポリマーが正味電荷が負である請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 7】

荷電ポリマーが正味電荷が正である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

荷電ポリマーがヘパリン硫酸を含むものである請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 9】

1 個以上のアフィニティー分子の少なくとも 1 個が検出マーカーで標識されている請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

1 個以上のアフィニティー分子の少なくとも 1 個が荷電キャリアー分子と結合してアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートを形成しており、荷電キャリアー分子は 1 個以上のアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離特性に変化を生じさせる請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 11】

アフィニティー分子が蛋白質 - 蛋白質相互作用、蛋白質 - 化学物質相互作用又は化学物質 - 化学物質相互作用により分析物と結合する分子である請求項 1 又は 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

アフィニティー分子が抗原 - 抗体相互作用、糖鎖 - レクチン相互作用、酵素 - インヒビター相互作用、蛋白質 - ペプチド鎖相互作用、染色体もしくは核酸鎖 - 核酸鎖相互作用、 50

ヌクレオチド - リガンド相互作用又は受容体 - リガンド相互作用により分析物と結合する分子である請求項 1 又は 10 に記載の方法。

【請求項 13】

アフィニティー分子が、抗体、抗体の Fab、F(ab')<sub>2</sub> 又は Fab' フラグメント、抗体可変領域、レクチン、アビジン、受容体、アフィニティーペプチド、アプタマー、及び DNA 結合蛋白質からなる群から選択される請求項 1 又は 10 に記載の方法。

【請求項 14】

荷電キャリアー分子がアニオン性分子又はカチオン性分子である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

荷電キャリアー分子が荷電ポリマーと同じ正味電荷をもつ分子である請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

荷電キャリアー分子が核酸鎖又はスルホン化ポリペプチドを含むアニオン性分子である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

荷電キャリアー分子が、DNA、RNA、カチオン性ポリマー、又はスルホン化ポリペプチドを含む請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

荷電キャリアー分子が 1 種以上の合成配列を含む DNA を含む請求項 17 に記載の方法

20

【請求項 19】

1 種以上の合成配列がリンカー基又はリンカー反応性基を含む 1 種以上のヌクレオチド類似体を含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

リンカー基又はリンカー反応性基がアミノ基、チオール、カルボキシル基、イミダゾール基、又はスクシンイミド基を含む請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

更に、検出マーカをリンカー基又はリンカー反応性基に共有結合させる段階を含む請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

少なくとも 1 個のアフィニティー分子が検出マーカで標識されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 1 個のコンジュゲート又はコンジュゲートを形成していない少なくとも 1 個のアフィニティー分子が検出マーカで標識されている請求項 10 に記載の方法。

【請求項 24】

コンジュゲートを形成するアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の少なくとも一方が検出マーカで標識されている請求項 10 に記載の方法。

【請求項 25】

コンジュゲートの荷電キャリアー分子が検出マーカで標識されている請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 26】

コンジュゲートのアフィニティー分子が検出マーカで標識されている請求項 10 に記載の方法。

【請求項 27】

検出マーカが蛍光色素、発光色素、燐光色素、蛍光蛋白質、発光蛋白質もしくは粒子、放射性トレーサー、化学発光化合物、レドックスメディエーター、起電性化合物、酵素、金コロイド粒子、又は銀粒子である請求項 9、21、22、23、24、25 又は 26 に記載の方法。

50

## 【請求項 28】

分離が分離チャンネル中の分離媒体によるコンジュゲート又は複合体の電気泳動分離を含む請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 29】

分離媒体がサイズ排除樹脂、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリエチレンオキシド (PEO)、スクロースとエピクロロヒドリンのコポリマー、ポリビニルピロリドン (PVP)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC)、ポリ-N, N-ジメチルアクリルアミド (pDMA)、又はアガロースゲルを含む請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

分離媒体が更に荷電ポリマーを含む請求項 28 に記載の方法。

10

## 【請求項 31】

荷電ポリマーが分離媒体中に約 0.01 ~ 5% の濃度で存在する請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

荷電ポリマーが分離媒体中に約 0.05 ~ 2% の濃度で存在する請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 33】

更に、サンプルを含有するバッファーに荷電ポリマーを導入する段階を含む請求項 28 に記載の方法。

20

## 【請求項 34】

荷電ポリマーがサンプルバッファー中に約 0.001 ~ 2% の濃度で存在する請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

分離チャンネルが約 0.1 ~ 200 ミクロンの少なくとも 1 個の横断面マイクロスケール寸法をもつ請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 36】

段階 (i) が少なくとも 1 個が検出マーカで標識された 1 個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識された 1 個以上のアフィニティー分子とを含む複合体を形成させる段階を含み；

30

段階 (ii) がマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子から複合体を分離する段階を含む；

段階 (iii) が、

(a) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；

(b) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；

アフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有するものである請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 37】

段階 (i) がアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートの少なくとも 1 個が検出マーカで標識された、1 個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を形成させる段階を含み；

段階 (ii) がマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された少なくとも 1 個のコンジュゲートから複合体を分離する段階を含み；

50

段階 ( i i i ) が、

( a ) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と ;

( b ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み ;

コンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 38】

段階 ( i ) がアフィニティー分子の少なくとも1個又はコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカで標識されたものであり、1個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートを含む複合体を形成させる段階を含み ;

段階 ( i i ) がマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子又は検出マーカで標識されたコンジュゲートから複合体を分離する段階を含み ;

20

段階 ( i i i ) が、

( a ) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と ;

( b ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み ;

アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離特性に変化を生じることが可能な性質を有するものである請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 39】

サンプル中の分析物の測定方法であって、

( i ) 検出マーカで標識された分析物又は検出マーカで標識された分析物の類似体及び1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティー分子との第1の複合体及び標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と ;

( i i ) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第2の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は遊離の標識類似体から第2の複合体を分離する段階と ;

40

( i i i ) 分離された第2の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階と ;

( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み ;

アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似

50

体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものである前記方法。

【請求項 40】

段階 ( i ) が検出マーカーで標識された分析物又は検出マーカーで標識された分析物の類似体及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの第 1 の複合体及び標識分析物又は標識類似体とコンジュゲートとの第 2 の複合体を形成させる段階を含み；

段階 ( i i ) がマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第 2 の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は遊離の標識類似体から第 2 の複合体を分離する段階を含み；

段階 ( i i i ) が分離された第 2 の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階を含み；

段階 ( i v ) が測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；

コンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の分離特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

段階 ( i ) が検出マーカーで標識された分析物又は検出マーカーで標識された分析物の類似体、1 個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第 1 の複合体及び標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第 2 の複合体を形成させる段階を含み；

段階 ( i i ) がマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第 2 の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は標識類似体から第 2 の複合体を分離する段階を含み；

段階 ( i i i ) が分離された第 2 の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階を含み；

段階 ( i v ) が測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；

アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の各分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の分離特性に変化を生じることが可能な性質を有するものである請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

サンプル中の分析物の測定方法であって、

10

20

30

40

50

( i ) 荷電キャリアー分子と結合した分析物又は荷電キャリアー分子と結合した分析物の類似体及び検出マーカーで標識された1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、荷電キャリアー分子と結合した分析物又は荷電キャリアー分子と結合した類似体と標識アフィニティー分子との第1の複合体及びサンプル中の分析物と標識アフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と；

( i i ) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第1の複合体を第2の複合体から分離する段階と；

( i i i ) 分離された第1の複合体の量又は第2の複合体の量を測定する段階と；

( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；

アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物又はサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した分析物上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した類似体上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子が分析物又は類似体と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより第1の複合体の分離特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである前記方法。

【請求項43】

サンプルが血清、血漿、全血、組織抽出物、細胞抽出物、核抽出物、培地、微生物培養抽出物、分子ライブラリーのメンバー、臨床サンプル、唾液検体、大便検体、脳髄液、尿サンプル、尿道-性器スワブ、咽喉スワブ、又は環境サンプルを含む請求項1に記載の方法。

【請求項44】

分析物がAFP、hCG、TSH、FSH、LH、インターロイキン、Fasリガンド、CA19-9、CA125、PSA、HbsAg、抗HIV抗体、又はT4を含む請求項1に記載の方法。

【請求項45】

荷電キャリアー分子とアフィニティー分子との遊離のコンジュゲートと、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの複合体の分離用組成物であって、組成物が分離媒体と荷電ポリマーを含む前記組成物。

【請求項46】

荷電ポリマーが多糖類、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、合成高分子化合物、セラミック及びそれらの複合体からなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項45に記載の組成物。

【請求項47】

荷電ポリマーがpoly-dIdC、ヘパリン硫酸、デキストラン硫酸、ポリタングステン酸、ポリアネートルスルホン酸、ポリビニル硫酸、ポリアクリレート、コンドロイチン硫酸、プラスミドDNA、仔ウシ胸腺DNA、サケ精子DNA、セルロースに結合したDNA、ガラス粒子、コロイドガラス、及び乳白ガラスからなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項45に記載の組成物。

【請求項48】

荷電ポリマーがヘパリン硫酸である請求項47に記載の組成物。

【請求項49】

分離媒体がサイズ排除樹脂、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリエチレンオキシド(PEO)、スクロースとエピクロロヒドリンのコポリマー、ポリビニルピロリドン(PVP)、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)、ポリ-N,N-ジメチルアクリルアミド(pDMA)、又はアガロースゲルを含む請求項45に記載

載の組成物。

【請求項 50】

ヘパリン硫酸が分離媒体中に約 0.01 ~ 5% の濃度で存在する請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 51】

サンプル中の対象分析物の濃縮方法であって、

(i) アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と

；  
(ii) 約 0.1 ~ 500 ミクロンの少なくとも 1 個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも 1 個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルを使用することにより複合体を濃縮する段階；を含み

荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせるものである前記方法。

【請求項 52】

サンプル中のノイズ成分の濃度が低いか又はゼロである領域に複合体を移動させてこの領域で濃縮する請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階が約 0.1 ~ 500 ミクロンの少なくとも 1 個のマイクロスケール寸法を有する濃縮チャンネルに流体的に接続されたマイクロチャンネルで実施される請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

複合体を濃縮する段階が濃縮チャンネルでバッファーを使用することにより実施され、バッファーが濃縮段階 (ii) で適用される複合体を含む溶液中の複合体の電気泳動移動度よりも濃縮チャンネルにおけるバッファー中の複合体の電気泳動移動度を遅くさせる性質をもつ請求項 51 に記載の方法。

【請求項 55】

複合体を濃縮する段階が荷電キャリアー分子の電荷に基づいて複合体とノイズ成分の電気泳動移動度の差を利用することにより実施される請求項 51 に記載の方法。

【請求項 56】

複合体を濃縮する段階が荷電キャリアー分子の電荷に基づいて複合体とノイズ成分の吸着性の差を利用することにより実施される請求項 51 に記載の方法。

【請求項 57】

複合体を濃縮する段階が電場増幅サンプルスタッキング法 (FASS)、電場増幅サンプル注入法 (FA SI)、等速電気泳動法 (ITP)、等電点電気泳動法 (IF) 及び固相抽出法 (SPE) からなる群から選択される濃縮法により実施される請求項 51 に記載の方法。

【請求項 58】

複合体を濃縮する段階が電場増幅サンプルスタッキング法 (FASS) 及び等速電気泳動法 (ITP) からなる群から選択される濃縮法により実施される請求項 51 に記載の方法。

【請求項 59】

荷電キャリアー分子がアニオン性分子又はカチオン性分子である請求項 51 に記載の方法。

【請求項 60】

荷電キャリアー分子が核酸鎖又はスルホン化ポリペプチドを含むアニオン性分子である請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

10

20

30

40

50



荷電キャリアー分子がDNA、RNA、カチオン性ポリマー、又はスルホン化ポリペプチドを含む請求項51に記載の方法。

【請求項62】

荷電キャリアー分子が1種以上の合成配列を含むDNAを含む請求項61に記載の方法。

【請求項63】

1種以上の合成配列がリンカー基又はリンカー反応性基を含む1種以上のヌクレオチド類似体を含む請求項62に記載の方法。

【請求項64】

リンカー基又はリンカー反応性基がアミノ基、チオール、カルボキシル基、イミダゾール基、又はスクシンイミド基を含む請求項63に記載の方法。

10

【請求項65】

更に、検出マーカ―をリンカー基又はリンカー反応性基に共有結合させる段階を含む請求項64に記載の方法。

【請求項66】

1種以上の合成配列がヌクレオチドのホスホロチオエート類似体、酸素の代わりにメチレン基をリボース環に含むヌクレオチド、又は2'-糖デオキシ置換基を2'-フルオロ、2'-O-メチル、2-O-アルコキシル、及び2'-O-アシル修飾で置換したヌクレオチドから構成される群から選択される請求項62に記載の方法。

【請求項67】

接触段階が、更に、サンプルを1個以上のアフィニティー分子と接触させて分析物とコンジュゲートとアフィニティー分子の複合体を形成させる段階を含む請求項51に記載の方法。

20

【請求項68】

アフィニティー分子が蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-化学物質相互作用又は化学物質-化学物質相互作用により分析物と結合する分子である請求項51又は67に記載の方法。

【請求項69】

アフィニティー分子が抗原-抗体相互作用、糖鎖-レクチン相互作用、酵素-インヒビター相互作用、蛋白質-ペプチド鎖相互作用、染色体もしくは核酸鎖-核酸鎖相互作用、ヌクレオチド-リガンド相互作用又は受容体-リガンド相互作用により分析物と結合する分子である請求項51又は67に記載の方法。

30

【請求項70】

アフィニティー分子が抗体、抗体のFab、F(ab')<sub>2</sub>又はFab'フラグメント、抗体可変領域、レクチン、アビジン、受容体、アフィニティーペプチド、アダマー、及びDNA結合蛋白質からなる群から選択される請求項51又は67に記載の方法。

【請求項71】

少なくとも1個のコンジュゲート又はコンジュゲートを形成していない少なくとも1個のアフィニティー分子が検出マーカ―で標識されている請求項67に記載の方法。

【請求項72】

コンジュゲートを形成するアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の少なくとも一方が検出マーカ―で標識されている請求項51に記載の方法。

40

【請求項73】

コンジュゲートの荷電キャリアー分子が検出マーカ―で標識されている請求項51に記載の方法。

【請求項74】

コンジュゲートのアフィニティー分子が検出マーカ―で標識されている請求項51に記載の方法。

【請求項75】

検出マーカ―が蛍光色素、発光色素、燐光色素、蛍光蛋白質、発光蛋白質もしくは粒子

50

、放射性トレーサー、化学発光化合物、レドックスメディエーター、起電性化合物、酵素、金コロイド粒子、又は銀粒子である請求項 67、71、72、73 又は 74 に記載の方法。

【請求項 76】

接触段階及び / 又は濃縮段階を荷電ポリマーの存在下を実施する請求項 51 又は 67 に記載の方法。

【請求項 77】

荷電ポリマーがポリアニオン性ポリマー又はポリカチオン性ポリマーである請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

荷電ポリマーが多糖類、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、合成高分子化合物、セラミック及びそれらの複合体からなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項 77 に記載の方法。

10

【請求項 79】

荷電ポリマーが poly - d I d C、ヘパリン硫酸、デキストラン硫酸、ポリタングステン酸、ポリアネートルスルホン酸、ポリビニル硫酸、ポリアクリレート、コンドロイチン硫酸、プラスミド DNA、仔ウシ胸腺 DNA、サケ精子 DNA、セルロースに結合した DNA、ガラス粒子、コロイドガラス、及び乳白ガラスからなる群から選択されるポリアニオン性ポリマーである請求項 76 に記載の方法。

【請求項 80】

荷電ポリマーがポリアリルアミン類、ポリリジン、ポリヒスチジン、キトサン、プロタミン、ポリエチレンイミン及びポリアルギニンからなる群から選択されるポリカチオン性ポリマーである請求項 76 に記載の方法。

20

【請求項 81】

荷電ポリマーが正味電荷が負である請求項 76 に記載の方法。

【請求項 82】

荷電ポリマーが正味電荷が正である請求項 76 に記載の方法。

【請求項 83】

荷電キャリアー分子と荷電ポリマーが同じ正味電荷である請求項 76 に記載の方法。

【請求項 84】

荷電ポリマーがヘパリン硫酸を含む請求項 81 に記載の方法。

30

【請求項 85】

濃縮段階が濃縮チャンネル中の濃縮媒体によるコンジュゲート又は複合体の電気泳動濃縮を含む請求項 51 又は 67 に記載の方法。

【請求項 86】

濃縮媒体がサイズ排除樹脂、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコール ( P E G )、ポリエチレンオキシド ( P E O )、スクロースとエピクロロヒドリンのコポリマー、ポリビニルピロリドン ( P V P )、ヒドロキシエチルセルロース ( H E C )、ポリ - N , N - ジメチルアクリルアミド ( p D M A )、又はアガロースゲルを含む請求項 85 に記載の方法。

40

【請求項 87】

濃縮媒体が更に荷電ポリマーを含む請求項 85 に記載の方法。

【請求項 88】

荷電ポリマーが濃縮媒体中に約 0 . 0 1 ~ 5 % の濃度で存在する請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

荷電ポリマーが濃縮媒体中に約 0 . 0 5 ~ 2 % の濃度で存在する請求項 87 に記載の方法。

【請求項 90】

更に、サンプルを含有するバッファーに荷電ポリマーを導入する段階を含む請求項 85

50

に記載の方法。

【請求項 9 1】

荷電ポリマーがサンプルバッファー中に約 0.001 ~ 2% の濃度で存在するヘパリン硫酸を含む請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

濃縮チャンネルが約 0.1 ~ 200 ミクロンの少なくとも 1 個の横断面マイクロスケール寸法をもつ請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

サンプル中の対象分析物の検出又は同定方法であって、

( i ) 分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と ;

( i i ) 約 0.1 ~ 500 ミクロンの少なくとも 1 個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも 1 個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルを使用することにより複合体を濃縮する段階と ;

( i i i ) 約 0.1 ~ 500 ミクロンの少なくとも 1 個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも 1 個の分離チャンネルを含み、分離チャンネルに荷電ポリマーを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルを使用することにより複合体と未結合のコンジュゲートとを分離する段階と ;

( i v ) 複合体を検出して分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定する段階を含み、接触、濃縮及び / 又は分離段階が検出干渉を低減する荷電ポリマーの存在下に実施され ;

荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせるものである前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

( 関連出願とのクロスリファレンス )

本願は米国仮特許出願第 60 / 462, 636 号 ( 出願日 2003 年 4 月 14 日 ) 及び 60 / 500, 177 号 ( 出願日 2003 年 9 月 4 日 ) の優先権を主張し、その全開示内容を参考資料として本明細書に組込む。

【0002】

( 発明の技術分野 )

本発明は移動度シフトアッセイにおける干渉を低減するための方法と組成物の分野に関する。本発明は例えば移動度シフトアッセイに干渉するサンプル成分をブロックするための荷電ポリマーと、干渉を低減するためのこれらのポリマー及び組成物の対応する使用方法を提供する。本発明は更に、マイクロフルイディックデバイスでサンプルを高度に濃縮するための方法の分野にも関する。本発明は例えば荷電キャリアー分子とサンプルを濃縮するための前記分子の使用方法も提供する。

【背景技術】

【0003】

移動度シフトアッセイは生体分子間の会合を検出及び定量するために有用な方法である。例えば電気泳動又はクロマトグラフィーアッセイで分子の保持時間の变化から結合分子の存在を確認することができる。結合は抗体 - 抗原相互作用のように特異的な場合と、正荷電分子と負荷電ポリマーのイオン吸引のように非特異的な場合がある。アッセイ結果のずれを防ぐためには、移動度シフトアッセイにおけるサンプル成分の非特異的相互作用に起因する干渉を最小限にする必要がある。

【0004】

分離媒体での移動度シフト分析は多数の形態をとることができる。例えば、遊離核酸を

10

20

30

40

50

蛋白質と結合させた場合の保持時間の変化をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により観察することができる。SEC樹脂は遊離核酸が侵入するには十分大きく且つ核酸/蛋白質対が侵入するには小さ過ぎる細孔をもつことができる。核酸/蛋白質対はSEC樹脂の周囲の容積内を迅速に流れ、遊離核酸は樹脂内外の総容積をよりゆっくりと流れる。遊離核酸と核酸/蛋白質対の間には保持時間の「シフト」が生じる。更に、検出された核酸/蛋白質ピークのサイズを解析し、元のサンプル中の蛋白質の量を定量することができる。干渉サンプル成分の存在はシフト検出又は定量アッセイの結果を無効にしかねない。

#### 【0005】

移動度シフト分析の別例では、大分子の移動を制限し且つ小分子をより自由に流動させるシービングポリマー又はゲルの分離媒体を通して遊離核酸と核酸/蛋白質対をキャピラリー電気泳動（CE）により分離することができる。CEでは、キャピラリーチューブに直流を流すことにより電気浸透バッファ一流を生成する。電流を印加すると、正荷電イオンとそれらに会合した溶媒和水分子（solvating water molecules）がカソードに向かって移動し、電気浸透流を生成する。キャピラリーチューブの内腔に配置したシービングポリマー分離媒体を通してこの流れによりサンプルを輸送し、移動度シフトの検出のためにサンプル分子をサイズにより分離することができる。大きい核酸/蛋白質対は遊離核酸よりも捕捉され、妨害されるので、遅れて媒体から排出される。例えば、蛍光又は吸光度検出器によりキャピラリーチューブからの溶出をモニターし、時間ピークを検出してチャートにプロットし、遊離核酸と核酸/蛋白質対の溶出の時間差ないし「移動度シフト」を測定することができる。

10

20

#### 【0006】

最近、種々の分野、例えばDNA、RNA、蛋白質及び代謝産物の分析でマイクロスケールチャンネルデバイスを利用するマイクロフルイディクス技術の応用は著しく進歩している。このようなマイクロフルイディクス技術には、試薬容量の低減、高分解能、操作時間の短縮、及び溶液取り扱いの容易さ等の利点がある。

#### 【0007】

人体由来サンプル（例えば血液又は細胞溶解液）等の所定の複合サンプルはアッセイ成分と非特異的に結合する干渉成分を含んでいる可能性があるので問題となる。例えば、対象となる特異的結合相互作用が転写因子と特異的ターゲットDNA配列の結合である場合には、非特異的結合サンプル成分が移動度シフト測定の検出に干渉する恐れがある。干渉成分はターゲットDNAと結合し、分離媒体内を移動しない不溶性複合体となる可能性がある。干渉成分はターゲットDNAと結合することによりノイズの多いバックグラウンドや疑陽性ピークを生じる可能性がある。いずれにせよ、ターゲットDNAの非特異的結合は移動度シフト分析の感度及び/又は確度を低下させる恐れがある。

30

#### 【0008】

非特異的結合はDNA結合蛋白質の研究で問題となっている。この問題は非特許文献1で検討されており、負荷電DNA分子と非特異的に結合する可能性のある正荷電蛋白質を洗い流しながらアニオン交換樹脂（QAE-Sephadex）を使用して負荷電血清蛋白質を吸着させている。吸着した蛋白質をQAE-Sephadexから溶出させた後にDNA-セルロースにアプライしている。

40

#### 【0009】

DNA-セルロースと結合した蛋白質をDNA結合蛋白質として同定している。この技術はDNA-セルロースと非特異的に結合した所定の正荷電蛋白質を洗い流していると思われるが、洗い流された蛋白質の一部は恐らく同定されていないDNA結合蛋白質であったと思われる。

#### 【0010】

DNA結合アッセイの前に全正荷電蛋白質を除去する代わりに、ポリアニオンブロッキング剤をアッセイ溶液に添加し、非特異的結合を最小限にすることができる。非特許文献2では、poly dIdCをDNA結合ゲル電気泳動移動度シフトアッセイのランニングバッファに添加し、DNAに非特異的に結合する蛋白質の影響を低減している。この

50

ようなストラテジーでは、poly dI dCは非特異的DNA結合分子についてターゲットDNAと競合することにより、特異的に結合した蛋白質の移動度シフトシグナルを増強しながら非特異的結合干渉を低減することができる。理論的には、ターゲットDNAに特異的なDNA結合蛋白質は静電的及び特異的結合親和性の両者をもつターゲットDNAとより強力に結合することができるので、正電荷をもつ場合でも検出することができる。このブロック技術はDNA結合蛋白質の検出を強化する方法のひとつであるが、他の型の特異的結合相互作用に起因する移動度シフトの検出を強化する方法であるとは言えない。

#### 【0011】

移動度シフトはアフィニティー分子と分析物の他の相互作用でも認められる場合がある。移動度シフトは例えば抗体が抗原と結合する場合や、多糖がレクチンと結合する場合に認められる。しかし、これらの分子のクロマトグラフィーや電気泳動ではこれらの分子における多重配座と不安定な電荷密度によりピークの幅が広く、良好に分離されない場合がしばしばみられる。予想されるアフィニティー分子/分析物対が多様であることから、各対に特別な移動度シフトアッセイの開発が必要である。これらの問題は標準条件下のアッセイで高度に分解するキャリアーポリマーにアフィニティー分子を結合させることで回避することができる。キャリアー/アフィニティー分子コンジュゲートを使用する技術の1例は例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む特許文献1「電気泳動法」に記載されている。移動度シフト分析で均一キャリアー分子をアフィニティー分子に使用すると分解能を改善することができるが、非特異的結合に起因する干渉の問題が残っている。 10 20

#### 【0012】

従って、移動度シフトアッセイ、特にアフィニティー分子キャリアーを利用するアッセイにおいて干渉をブロックする方法が依然として必要とされている。粗サンプル又は複合サンプルの移動度シフトアッセイは移動分子との非特異的結合相互作用に起因する干渉をブロックすることが可能な組成物、方法及び装置の恩恵を受けることができる。本発明はこれらの構成と以下の記載から明らかになる構成を提供する。

#### 【0013】

上述のように、移動度シフトアッセイはターゲット分析物分子（本明細書では「目的物質」又は「対象分析物」とも言う）の非常に効率的な分離及び検出が可能である。更に、このような移動度シフトアッセイとマイクロフルイディックデバイスを併用すると、アッセイの効果は増す。マイクロフルイディックデバイスを使用する移動度シフトアッセイの感度を高めるためには、移動度シフトアッセイが実施されるデバイスの分離領域にサンプルを添加する前にサンプル中の目的物質（例えば対象分析物）を濃縮する種々の方法を利用することができる。例えば、(i)濃縮ドメインと分離ドメインの導電率の差を利用するサンプル濃縮法である電場増幅サンプルスタッキング法（Field Amplification Sample Stacking：FASS）（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む特許文献2“Microfluidic Methods, Devices and Systems for In Situ Material Concentration”，非特許文献3；非特許文献4，非特許文献5）、(ii)FASSにおける濃縮ドメインと分離ドメインの間に微小水プラグを挿入することによりサンプルを濃縮する方法である電場増幅サンプル注入法（Field Amplification Sample Injection：FASI）（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む非特許文献6）、(iii)リーディング電解液とトレーリング電解液の間に挟まれたドメインにおけるイオン移動度の差を利用するサンプル濃縮法である等速電気泳動法（Isotachopheresis：ITP）（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む非特許文献7；非特許文献8；及び非特許文献9，非特許文献10）、(iv)物質間の等電点の差を利用する濃縮/分離法である等電点電気泳動法（Isoelectric Focusing：IF）（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む非特許文献11，非特許文献 30 40 50

12)、及び(v)固相(例えば受容体等の吸着剤を結合した固相)と目的物質間の特異的相互作用を利用して目的物質を固相に吸着させる濃縮/分離法である固相抽出法(Solid Phase Extraction: SPE)(例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む非特許文献13)が挙げられる。

【0014】

しかし、上記従来方法を使用することにより目的物質を濃縮する場合には、不要成分(例えば目的物質の検出を妨害する所謂「ノイズ成分」)が目的物質と同時に濃縮されることが多い。その結果、従来方法により濃縮したサンプルを分離及び検出用サンプルとして使用すると、バックグラウンド及びノイズレベルの増加により検出感度が制限される恐れがある。更に、FASS、ITP及びIF等の電気泳動を利用する従来の濃縮法は非常に高分子量又は比較的低電荷の目的物質を効率的且つ高度に濃縮することができない。

10

【0015】

即ち、上記濃縮法では、目的物質が球形であると仮定すると、目的物質の移動度は下式：

$$\mu_e = q / 6 \quad r$$

(式中、 $\mu_e$ は特定イオンの電気泳動移動度であり、 $q$ はイオンの電荷であり、 $\eta$ は溶液の粘度であり、 $r$ はイオンの半径である)により示される。上記式から明らかのように、目的物質が非常に高分子量及び/又は低電荷をもつ場合には、式中の $r$ が大きく及び/又は式中の $q$ が小さくなるので目的物質の電気泳動移動度( $\mu_e$ )は低下する。従って、このような従来の濃縮法を使用する場合には、非常に高分子量及び/又は低電荷の目的物質を短時間で高度に濃縮することは困難である。更に、従来の濃縮法では、特に目的物質が目的物質と共に濃縮される傾向のある目的物質以外の種々の不要干渉成分(例えばノイズ成分)と複合サンプル中に共存する場合には、サンプル中の目的物質を濃縮するための反応条件を最適化するのは困難なことが多い。これは特に臨床診断分野で使用される血清サンプルの場合に該当し、このようなサンプルは多様な分子量及び電荷分布をもつ種々の被測定成分を含有している。上述のように、特にマイクロフルイディックデバイスと併用してバックグラウンド及びノイズレベルを増加せずに目的物質を高感度で検出できるように目的物質を効率的且つ高度に濃縮するための方法が開発されるならば有利である。本発明はこのような方法と、以下の記載から明らかになる他の構成を提供する。

20

【特許文献1】日本特許出願第WO02/082083号

30

【特許文献2】米国特許出願第10/206,386号

【非特許文献1】Brehm, BBRC 63:24-31, 1975

【非特許文献2】Cartheuser, Cell 43:439-448, 1985

【非特許文献3】Weiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C. E. Electrophoresis 2001, 22, 59-65

【非特許文献4】Britz-McKibbin, P., Bebauld, G. M., Chen, D. D. Y. Anal Chem. 2000, 72, 1729-1735

【非特許文献5】Ross, D., Locascio, L. E. Anal Chem. 2002, 74, 5137-5145

【非特許文献6】“Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis”, Chien, R. L., J. Chromatogr. 1991, 559, 141-148

40

【非特許文献7】Everaerts, F. M., Geurts, M. Mikkers, F. E. P., Verheggen, T. P. E. M. J. Chromatogr. 1976, 119, 129-155

【非特許文献8】Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 293-315

【非特許文献9】Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 317-332

50

【非特許文献10】Hirokawa, T, Okamoto, H. Ikuta, N., and Gas, B., "Optimization of Operational Modes for Transient Isotachopheresis Preconcentration-CZE," Analytical Sciences 2001, Vol. 17 Supplement i185

【非特許文献11】"High performance isoelectric focusing using capillary electrophoresis instrumentation", Wehr T.B., Am. Biotechnol. Lab. 1990, 8, 22

【非特許文献12】"Fast and high-resolution analysis of human serum transferring by high-performance isoelectric focusing in capillaries", Kilar F.B., Electrophoresis 1989, 10, 23-29 10

【非特許文献13】"Microchip-based purification of DNA from Biological Samples", Breadmore M.B., Anal. Chem. 2003, 75, 1880-1886

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

20

本発明は例えば遊離の（例えば未結合の）アフィニティー分子からの分析物とアフィニティー分子の複合体の分離、特に遊離の（例えば未結合の）コンジュゲートからの分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子のコンジュゲートの複合体の分離に対するサンプル成分干渉を例えば低減し、サンプル中の対象分析物を高感度で特異的に検出又は同定できるようにするための方法及び組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0017】

30

本発明の方法の代表的1態様では、サンプル中の対象分析物の検出又は同定方法が開示され、通常(i)分析物に対して親和性をもつ1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させて分析物とアフィニティー分子の複合体を形成させる段階と；(ii)約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法をもつ少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスで分離チャンネルを使用することにより、荷電ポリマーの存在下に複合体と未結合のアフィニティー分子を分離する段階と；(iii)複合体を検出して分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定する段階を含み、荷電ポリマーが検出干渉を低減するものである。

【0018】

本発明の1態様では、少なくとも1個のアフィニティー分子は蛍光色素、発光色素、燐光色素、蛍光蛋白質、発光蛋白質もしくは粒子、放射性トレーサー、化学発光化合物、レドックスメディエーター、起電性化合物、酵素、金コロイド粒子、又は銀粒子等の検出マーカで標識されている。あるいは、アフィニティー分子が荷電キャリアー分子とコンジュゲートを形成する場合には、コンジュゲートを形成するアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の少なくとも一方は通常検出マーカで標識されている。 40

【0019】

更に人体に由来するサンプル等のサンプル中の対象分析物の数種の他の測定又は同定方法も開示される。代表的1代替態様では、生体由来サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、通常、(i)少なくとも1個が検出マーカで標識された1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識された1個以上のアフィニティー分子とを含む複合体を形成させる段階と；(ii)マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子から複合 50

体を分離する段階と；( i i i ) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；アフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有するものである。

#### 【 0 0 2 0 】

別の代替態様では、生体由来サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、通常、( i ) アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカで標識された1個以上のコンジュゲートに、分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を形成させる段階と；( i i ) マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体に関与しない検出マーカで標識されたコンジュゲートから複合体を分離する段階と；( i i i ) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じることが可能な性質を有するものである。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明の更に別の代替態様では、生体由来サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、通常、( i ) アフィニティー分子の少なくとも1個又はコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカで標識された、1個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートを含む複合体を形成させる段階と；( i i ) マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された遊離アフィニティー分子又は検出マーカで標識されたコンジュゲートから複合体を分離する段階と；( i i i ) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明の更に別の代替態様では、生体由来サンプル中の分析物の測定方法が開示され、通常、( i ) 検出マーカで標識された分析物又は検出マーカで標識された分析物の類似体及び1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティー分子との第1の複合体及び標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と；( i i ) マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に第2の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は遊離の標識類似体から第2の複合体を分離する段

10

20

30

40

50



階と；( i i i ) 分離された第 2 の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものである。

10

#### 【 0 0 2 3 】

本発明の別の態様は生体由来サンプル中の分析物の測定方法を開示し、通常、( i ) 検出マーカで標識された分析物又は検出マーカで標識された分析物の類似体及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの第 1 の複合体及び標識分析物又は標識類似体とコンジュゲートとの第 2 の複合体を形成させる段階と；( i i ) マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に第 2 の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は遊離の標識類似体から第 2 の複合体を分離する段階と；( i i i ) 分離された第 2 の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

20

30

#### 【 0 0 2 4 】

更に別の代替態様では、生体由来サンプル中の分析物の測定方法が開示され、通常、( i ) 検出マーカで標識された分析物又は検出マーカで標識された分析物の類似体、1 個以上のアフィニティー分子、及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第 1 の複合体及び標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第 2 の複合体を形成させる段階と；( i i ) マイクロフルイディックデバイスのマイクロフルイディックチャンネルで荷電ポリマーの存在下に第 2 の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物又は標識の類似体から第 2 の複合体を分離する段階と；( i i i ) 分離された第 2 の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物もしくは分離された遊離の標識類似体の量を測定する段階と；( i v ) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の各分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性

40

50

質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

【0025】

別の代替態様では、サンプル中の分析物の測定方法が開示され、通常、(i) 荷電キャリアー分子と結合した分析物又は荷電キャリアー分子と結合した分析物の類似体と検出マーカーで標識された1個以上のアフィニティー分子とに分析物を含有するサンプルを接触させ、荷電キャリアー分子と結合した分析物又は荷電キャリアー分子と結合した類似体と標識アフィニティー分子との第1の複合体及びサンプル中の分析物と標識アフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第1の複合体を第2の複合体から分離する段階と；(iii) 分離された第1の複合体の量又は第2の複合体の量を測定する段階と；(iv) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物又はサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した分析物上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した類似体上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子が分析物又は類似体と結合して分析物又は類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより第1の複合体の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

10

20

【0026】

本発明は更に荷電キャリアーポリマーとアフィニティー分子との遊離のコンジュゲートと、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの複合体を分離するための組成物に関し、1態様では、分離媒体と荷電ポリマーとを含む。本発明は更に、サンプル中の対象分析物を高感度で特異的に検出又は同定できるように、マイクロフルイディックデバイスを使用することによる分離及び検出前に目的物質（例えば分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体、特に分析物、アフィニティー物質及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体）を高濃度に濃縮するための方法も提供する。本発明は更に、目的物質を容易に濃縮できるように反応条件を最適化するための方法を提供する。

30

【0027】

本発明の方法の代表的な1態様では、サンプル中の対象分析物の濃縮方法が開示され、通常(i) アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と；(ii) 約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルを使用することにより複合体を濃縮する段階を含み；荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせるものである。

40

【0028】

本発明は更に、サンプル中の対象分析物を高感度で特異的に検出又は同定できるように、例えば目的物質（例えば分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体、特に分析物、アフィニティー物質及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体）を濃縮し、遊離の（例えば未結合の）アフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲートからの複合体の分離に対するサンプル成分

50

干渉を低減するための方法を提供する。

【0029】

本発明の方法の代表的な1態様では、サンプル中の対象分析物の検出又は同定方法が開示され、通常、(i)分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに接触させ、分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と；(ii)約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の濃縮チャネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャネルを使用することにより複合体を濃縮する段階と；(iii)約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の分離チャネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャネルを使用することにより複合体と未結合のコンジュゲートとを分離する段階と；(iv)複合体を検出して分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定する段階を含み；荷電ポリマーが検出干渉を低減するものであり；荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせるものである。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

I. 移動度シフトアッセイ

本発明は例えば所謂移動度シフトアッセイに適用することができる。本発明では、移動度シフトアッセイは目的物質(例えば対象分析物)と目的物質に対して親和性を有する物質(例えばアフィニティー分子)を分離及び分析する目的で実施され、これらを接触させて目的物質とアフィニティー物質の複合体を形成させた後にマイクロフルイディックデバイスを使用することにより両者の移動速度差に基づいて複合体に關与しないアフィニティー物質(例えば遊離の又は未結合のアフィニティー物質)から複合体を分離し、分離された複合体又は遊離のアフィニティー物質を分析する。即ち、本発明の移動度シフトアッセイは例えばマイクロフルイディックデバイスを使用して例えばアフィニティー分子とアフィニティー分子/分析物複合体、特に分析物に結合した荷電キャリアー分子/アフィニティー分子コンジュゲートと分析物に結合していない荷電キャリアー分子/アフィニティー分子コンジュゲートの移動速度差を検出する。

20

【0031】

移動度シフトアッセイとしては、以下の方法を例示することができる：(i)通常、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子に接触させて分析物とアフィニティー分子とを含む複合体を形成させ、マイクロフルイディックデバイスの分離チャネルで複合体の形成に關与しない遊離のアフィニティー分子から複合体を分離し、分離された複合体又は遊離のアフィニティー分子の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出し、測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する方法；(ii)通常、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートに接触させて分析物とコンジュゲートとを含む複合体を形成させ、マイクロフルイディックデバイスの分離チャネルで複合体の形成に關与しない遊離のコンジュゲートから複合体を分離し、分離された複合体又は遊離のコンジュゲートの量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出し、測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する方法；(iii)通常、分析物を含有するサンプルを(a)アフィニティー分子と(b)アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートに接触させて分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートを含む複合体を形成させ、マイクロフルイディックデバイスの分離チャネルで複合体の形成に關与しない遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲートから複合体を分離する段階と、分離された複合体又は遊離のアフィニティー分子(及び/又は遊離のコンジュゲート)の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出し、測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する方法；(

30

40

50

i v) 通常、分析物を含有するサンプルを ( a ) 検出マーカで標識された分析物と ( b ) アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートに接触させて標識分析物とコンジュゲートとを含む複合体を形成させ、マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物から複合体を分離し、分離された複合体又は遊離の標識分析物の量を測定し、測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は標識分析物の存在を同定する方法；及び ( v ) 通常、 ( a ) 荷電キャリアー分子で標識された分析物と ( b ) 分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物の両者と結合することができ、少なくとも1個が検出マーカで標識された1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させて荷電キャリアー分子で標識された分析物と検出マーカで標識されたアフィニティー分子との複合体を形成させ、検出マーカで標識されたアフィニティー分子の遊離形態から複合体を分離し、分離された複合体又は検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子の量を測定し、測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は標識アフィニティー分子の存在を同定する方法。方法 ( i v ) 及び ( v ) では、分析物の類似体が抗体と結合する能力をもつ限り、分析物の標識類似体を使用することができる。

10

#### 【 0 0 3 2 】

##### I I . 本発明の方法

本発明は例えば上記移動度シフトアッセイにおける干渉を低減するための方法、及びこのような方法を実施するために使用される組成物を提供する。本発明の1特徴は上記移動度シフトアッセイで目的物質/アフィニティー物質複合体と複合体に関与しない遊離のアフィニティー物質との分離を荷電ポリマーの存在下に実施し、分離された複合体又は遊離のアフィニティー物質を分析する点にある。本発明では、「目的物質」なる用語は通常、測定又は同定しようとする物質 (例えばサンプル中の対象分析物) を意味し、「アフィニティー物質」とは通常、アフィニティー分子及び/又はアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートを意味し、「目的物質/アフィニティー物質複合体」なる用語は分析物/アフィニティー分子の複合体、分析物/アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体又は分析物/アフィニティー分子/アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体を意味する。

20

#### 【 0 0 3 3 】

サンプルがアフィニティー物質 (例えばアフィニティー分子又はアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート) と特異的に結合する分析物を含有している場合には、複合体は見かけ上大きくなる。この見かけのサイズシフトないし「移動度シフト」が分析物の存在を示す。しかし、アフィニティー物質と非特異的に結合するサンプル成分の存在下 (例えば特にアフィニティー物質がキャリアー分子と共役している場合) では、疑陽性移動度シフトが観察されたり、分離チャンネル内を移動しない不溶性複合体が形成される可能性がある。本発明の方法は干渉成分に起因する干渉を低減することができる荷電ポリマーを提供する。

30

#### 【 0 0 3 4 】

例えば、荷電キャリアー分子がDNAである移動度シフトアッセイでは、血清成分がアッセイに干渉する。ヘパリン硫酸等の荷電ポリマーを添加すると、干渉を低減することができる。図1Aは分離媒体におけるコンジュゲートピーク10とコンジュゲート/分析物複合体ピーク11の間の移動度シフトの電気泳動図を示す。血清をサンプルに添加すると、図1Bに示すように干渉成分は複合体ピーク11の保持時間、高さ及び面積を変化させる。荷電ポリマーをアッセイに添加すると、図1Cに示すように干渉変化を低減することができる。

40

#### 【 0 0 3 5 】

本発明の方法は例えば以下のように実施することができる。即ち、分析物を含有するサンプルを少なくとも1個のアフィニティー分子に接触させて分析物とアフィニティー分子との複合体を形成させ、約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分

50

離チャンネルを使用することにより、得られた複合体を荷電ポリマーの存在下に未結合のアフィニティー分子から分離する。その後、複合体を検出することにより分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定することができる。

【0036】

A. 荷電ポリマー

本発明の荷電ポリマーはアッセイに干渉するサンプル成分と相互作用することにより移動度シフトアッセイに対する干渉をブロックすることができる。特定理論に拘束するものではないが、逆電荷の干渉サンプル成分がコンジュゲートのアフィニティー分子及び/又は荷電キャリアー分子と結合するのに対して荷電ポリマーはコンジュゲートのアフィニティー分子及び/又は荷電キャリアー分子と同一電荷をもつので、このような干渉サンプル成分の結合に起因する移動度シフトアッセイにおける干渉を低減すると考えられる。荷電ポリマーと干渉成分の結合は例えば成分とアフィニティー分子及び/又はコンジュゲートとの非特異的結合に起因する疑陽性移動度シフトや、アフィニティー分子及び/又はコンジュゲート/成分複合体との不溶性複合体の形成に起因するアッセイの不成功を防止することができる。

10

【0037】

本発明の荷電ポリマーは例えばサンプル成分と逆の正味電荷（正又は負）をもつポリマーとすることができる。対応するアフィニティー物質（例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート）と同一型の（正又は負）正味電荷をもつ荷電ポリマーが好ましい。本発明の荷電ポリマーはポリアニオン性ポリマーを含むことができ、例えばヘパリン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン硫酸、ポリタングステン酸、ホスホタングステン酸、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸及びポリアネトールスルホン酸等の多糖類；DNA（例えばプラスミドDNA、仔ウシ胸腺DNA、サケ精子DNA、セルロースに結合したDNA、合成DNA等）及びRNA等のポリヌクレオチド；ポリアミノ酸（例えばポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸等）及び合成ポリペプチド等のポリペプチド；poly-dIdC、ポリビニル硫酸、ポリアクリレート等の合成高分子化合物；ガラス粒子、コロイドガラス、及び乳白ガラス等のセラミック；並びにそれらの複合体が挙げられる。荷電ポリマーはポリカチオン性ポリマーも含むことができ、例えばキトサン及びその誘導体等の多糖類；ポリリジン、ポリヒスチジン、ポリアルギニン、プロタミン、ヒストン、オルニチン等のポリペプチド；ポリアリルアミン、ポリエチレンジアミン、ポリビニルアミン等の合成高分子化合物；スベルミン及びスベルミジン等のポリアミン；カチオン性脂質；セラミック；並びにそれらの複合体が挙げられる。本発明の好適態様では、荷電ポリマーはアニオン性多糖類、好ましくはヘパリン硫酸を含む。

20

30

【0038】

本発明では、上記荷電ポリマーを単独又は適宜組み合わせで使用することができる。

【0039】

目的物質/アフィニティー物質複合体（例えば分析物/アフィニティー分子複合体、又は分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体）と複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質（例えば遊離のアフィニティー分子又は遊離のコンジュゲート）を荷電ポリマーの存在下で分離するためには、荷電ポリマーの存在下で分離を実施する。例えば、荷電ポリマーは少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルに存在していることが好ましい。具体的には、分離チャンネルに充填した分離媒体に荷電ポリマーを添加することが好ましい。分離媒体に荷電ポリマーが存在することにより、サンプル分析間の干渉サンプル成分のキャリアーオーバーを低減することができる。代替又は付加態様では、荷電ポリマーは目的物質と目的物質/アフィニティー物質複合体を含有する溶液（例えば水、ハイブリダイゼーションアッセイ、イムノアッセイ等で使用されるtris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファー）中に存在していてもよく、その後、得られた荷電ポリマーと目的物質と目的物質/アフィニティー物質複合体を含有する

40

50

溶液を分離チャンネルに添加する。更に、荷電ポリマーは目的物質と目的物質/アフィニティー物質複合体を含有する溶液をマイクロフルイディックデバイスに添加するために使用する溶液中に存在していてもよく、このような溶液としては、例えば分離に使用する溶離液やランニングバッファー（例えば水、ハイブリダイゼーションアッセイ、イムノアッセイ等で使用される *tris*-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファー）が挙げられる。

**【0040】**

上記方法において、荷電ポリマーを目的物質と目的物質/アフィニティー物質複合体を含有する溶液中に存在させるためには、以下の方法が例示される。(i) 目的物質を含有するサンプル又はサンプルを含有する溶液に荷電ポリマーを添加し、得られた目的物質と荷電ポリマーを含有する溶液をアフィニティー物質に接触させる；(ii) アフィニティー物質を含有する溶液に荷電ポリマーを添加し、得られたアフィニティー物質と荷電ポリマーとを含有する溶液を、目的物質を含有するサンプル又はサンプルを含有する溶液に接触させる；(iii) 目的物質を含有するサンプル又はサンプルとアフィニティー物質を含有する溶液を、荷電ポリマーを含有する溶液に添加する；あるいは(iv) 目的物質を含有するサンプル又はサンプルを含有する溶液をアフィニティー物質に接触させ、得られた目的物質と目的物質/アフィニティー物質複合体を含有する溶液を、荷電ポリマーを含有する溶液と混合する。上記方法において、荷電ポリマーは溶液又は乾燥粉末として添加することができる。

10

20

**【0041】**

本発明では、アフィニティー物質（例えばアフィニティー分子、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート）に接触させる前にサンプルと荷電ポリマーを混合することにより、反応速度の向上及び/又は所定干渉物質の沈殿が得られる。このような沈殿は濾過又は遠心により除去することができる。荷電ポリマーとアフィニティー物質（例えばアフィニティー分子、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート）の両者を溶液に加えることにより、分析物が荷電ポリマーとも非特異的に結合する場合であっても、アフィニティー物質を高い親和性で分析物と結合させることができる。従って、荷電ポリマーは少なくとも分離段階（例えば分離媒体中）に存在していることが好ましいが、付加及び/又は代替態様では、目的物質を含有するサンプルをアフィニティー物質（例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート）と接触させて複合体を形成させる段階にも存在していてもよい。本発明の好適態様では、サンプル中に存在する目的物質の回収率を増加するために、目的物質/アフィニティー物質複合体と遊離のアフィニティー物質の分離段階（例えば分離媒体中）と、目的物質を含有するサンプルとアフィニティー分子とを接触させて複合体を形成させる段階の両者に荷電ポリマーを存在させる。上記方法において、目的物質を含有するサンプルをアフィニティー分子に接触させて複合体を形成させる段階に荷電ポリマーを存在させるためには、以下の方法が例示される：(i) 目的物質を含有するサンプル又はサンプルを含有する溶液に荷電ポリマーを添加し、得られた目的物質と荷電ポリマーを含有する溶液をアフィニティー物質に接触させる；(ii) アフィニティー物質を含有する溶液に荷電ポリマーを添加し、得られたアフィニティー物質と荷電ポリマーを含有する溶液を、目的物質を含有するサンプル又はサンプルを含有する溶液に接触させる；及び(iii) 荷電ポリマーを含有する溶液に目的物質を含有するサンプル又はサンプルとアフィニティー物質を含有する溶液を添加する。上記方法では、荷電ポリマーを溶液又は乾燥粉末として添加することができる。

30

40

**【0042】**

サンプル溶液は分離媒体に添加する前に固体支持体上の荷電ポリマーと接触させ、干渉成分を吸着させることもできる。荷電ポリマーは場合により荷電ポリマーをサンプルから分離し易くするために固体支持体に結合させることができる。固体支持体は例えば特定荷電ポリマーを固体支持体に結合させるために必要な吸着相互作用又は結合化学に適合可能な任意固体マトリックスとすることができる。固体支持体は例えばガラス、プラスチック

50

、セルロース等とすることができる。固体支持体は例えばビーズ、顆粒、多孔質表面、又は平坦表面の形態とすることができる。多くの場合には、表面積対体積比の大きい固体支持体のほうが小さい支持体よりも干渉成分を効率的にブロックすることができる。荷電ポリマーと固体支持体の結合は例えばWalsh MKら, [J Biochem. Biophys. Methods (2001) 47(3): 221-31]に示されているように、当分野で通常使用されている従来方法で実施することができる。

#### 【0043】

荷電ポリマーを目的物質/アフィニティー物質複合体と遊離のアフィニティー物質の分離段階に存在させる場合には、分離段階(例えば分離チャンネル内の分離媒体中)における荷電ポリマーの濃度は使用する荷電ポリマーの種類に応じて変えることができる。通常、荷電ポリマーの濃度は荷電ポリマーの存在が移動度シフトアッセイにおいて分析物/アフィニティー分子複合体と任意の遊離のアフィニティー分子の分離、特に分析物/アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体と遊離のコンジュゲートの分離に対するサンプル成分の干渉を低減し得る任意の濃度とすることができる。分離チャンネル(例えば分離媒体内)における荷電ポリマーの濃度は通常、約0.01~5%(w/v)、好ましくは約0.05~2%(w/v)、より好ましくは約0.5~1.5%(w/v)、例えば約1%(w/v)である。

#### 【0044】

荷電ポリマーを目的物質を含有するサンプルをアフィニティー物質に接触させて複合体を形成させる段階に存在させる場合には、溶液(例えばバッファー)中に存在させる荷電ポリマーの濃度は使用する荷電ポリマーの種類に応じて変えることができる。通常、荷電ポリマーの濃度は荷電ポリマーの存在が分析物とアフィニティー物質の相互作用に影響を与えずに干渉を低減できる任意濃度とすることができる。目的物質とアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子、アフィニティー/キャリアー分子のコンジュゲート)を含有する溶液中の荷電ポリマーの濃度は通常、約0.001~2%(w/v)、例えば約0.01~2%(w/v)、好ましくは約0.001~1%(w/v)、例えば約0.02~1%(w/v)、より好ましくは約0.001~0.05%(w/v)、例えば約0.025~0.5%(w/v)、例えば約0.01%~0.05%(w/v)である。

#### 【0045】

##### B. サンプル

本発明のサンプルは潜在的に対象分析物を含有する任意材料とすることができる。サンプルとしては例えば血清、血漿、全血、組織抽出物、細胞抽出物、核抽出物、培地、微生物培養抽出物、分子ライブラリーのメンバー、臨床サンプル、唾液検体、大便検体、脳髄液、尿サンプル、尿道-性器スワブ、咽喉スワブ、環境サンプル及び/又は類似物が挙げられる。分析物が溶液中に遊離していない場合には、粉碎、溶解、抽出、濾過、遠心、及び当分野で公知の他の適切な技術により溶液中に放出させることができる。換言するならば、本発明を適用可能なサンプルとしては、体液(例えば血清、血漿、脳髄液、滑液、リンパ液等)、排泄物(例えば尿、糞便等)、生体由来検体(例えば喀出物、膿状物、皮膚剥離物等)、環境検体(例えば飲食物、水道水、海水、湖沼水、河川水、工場廃水、半導体洗浄液、医療器具洗浄液等)、並びに水及び当分野で通常使用されるバッファー(例えばtris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー等)に溶解することにより再構成されたそれらの処理物が例示される。

#### 【0046】

##### C. 対象分析物(目的物質)

分析物としては例えばペプチド鎖(例えばCペプチド、アンギオテンシンI等)、蛋白質[例えばイムノグロブリンA(IgA)、イムノグロブリンE(IgE)、イムノグロブリンG(IgG)、イムノグロブリンM(IgM)、イムノグロブリンD(IgD)、<sub>2</sub>-マイクログロブリン、アルブミン、それらの分解産物]、フェリチン等の血清蛋白質;アミラーゼ、アルカリホスファターゼ、<sub>2</sub>-グルタミル-トランスフェラーゼ、酸性ホスファターゼ、リパーゼ(例えば膵、胃等)、クレアチンキナーゼ(例えばCK-1、

10

20

30

40

50

CK-2、mCK等)、乳酸デヒドロゲナーゼ(例えばLDH1~LDH5等)、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(例えばASTm、ASTs等)、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ(例えばALTm、ALTs等)、コリンエステラーゼ(例えばChE1~ChE5等)、ロイシンアミノペプチダーゼ(例えばC-LAP、AA、CAP等)、レニン、蛋白質キナーゼ、チロシンキナーゼ等の酵素蛋白質;微生物(例えば結核菌、肺炎球菌、ジフテリア菌、髄膜炎菌、淋菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、腸内細菌、大腸菌、ピロリ菌等の細菌、風疹ウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ATLウイルス、AIDSウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ポリオウイルス、EBウイルス、HAV、HBV、HCV、HIV、HTLV等のウイルス、カンジダ、クリプトコッカス等の真菌類、レプトスピラ、梅毒トレポネーマ等のスピロヘータ、クラミジア、マイコプラズマ等)に由来する蛋白質又はペプチド又は糖鎖抗原;喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギーの原因となる各種アレルゲン[例えばハウスダスト、コナヒョウダニ(Dermatophagoides farinae)、ヤケヒョウヒダニ(Dermatophagoides pteronyssinus)等のダニ、スギ、ヒノキ、スズメノヒエ、ブタクサ、オオアワガエリ(Phleum pratense)、ハルガヤ(Anthoxanthum odoratum)、ライ麦等の花粉、ネコ、イヌ、カニ等の動物、コメ、卵白等の食物、真菌、昆虫、木材、薬剤、化学物質等];リポ蛋白質等の脂質;トリプシン、プラスミン、セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼ;フェトプロテイン(AFP)、前立腺特異抗原(PSA)、癌胎児性抗原(CEA)、PGI、PGII、<sup>2</sup>-マクログロブリン等の腫瘍マーカー蛋白質抗原;糖鎖(例えばCA19-9、PIVKA-II、CA125、例えば癌細胞により生産される特殊な糖鎖を有する物質が有する糖鎖等の腫瘍マーカー糖鎖抗原糖鎖、例えばABO糖鎖抗原等);レクチン(例えばコンカナバリンA、レンズマメレクチン、インゲンマメレクチン、チョウセンアサガオレクチン、小麦胚芽レクチン等);リン脂質(例えばカルジオリピン等);リポ多糖類(例えばエンドトキシン等);化学物質[例えば、ステロイドホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、PTH、T3、T4、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、インスリン、黄体形成ホルモン(LH)、FSH、プロラクチン等のホルモン、例えばトリブチル錫、ノニルフェノール、4-オクタチル-フェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)等の環境ホルモン];

受容体(例えばエストロゲン、TSH等に対する受容体);リガンド(例えばエストロゲン、TSH等);核酸;キャリアー蛋白質と共役した分析物;核酸と共役した分析物及びこれらに対する抗体が挙げられる。これに関連して、本発明でアフィニティー分子として使用される抗体には、パパインもしくはペプシン等のプロテイナーゼによる分解又は化学分解により生産された分解産物としてのFab、Fab'又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントも包含される。本発明は例えば以下の分析物、例えばフェトプロテイン、血清蛋白質、腫瘍マーカー、酵素、ホルモン、hCG、TSH、FSH、LH、キャリアー蛋白質と共役した分析物、核酸と共役した分析物等を測定するのに有用である。

#### 【0047】

##### D. アフィニティー分子

アフィニティー分子(例えばアフィニティー物質)はサンプル中の対象分析物に対して特異的親和性をもつ任意分子とすることができ、例えば抗体、抗体のFab、F(ab')<sub>2</sub>又はFab'フラグメント、抗体可変領域、レクチン、アビジン、受容体、アフィニティーペプチド、アプタマー、及びDNA結合蛋白質からなる群から選択することができる。アフィニティー分子は例えば酵素、抗体、ホルモン、サイトカイン、構成成分、シグナリング分子、及び所定受容体のリガンド等として機能し、場合により腫瘍マーカー、炎症マーカー、及び感染性疾患マーカーとして認識されるリガンド(例えばウイルス粒子、細菌細胞、蛋白質、ペプチド、炭水化物、抗原、脂質、ステロイド、小化学物質等)に対して特異的親和性を有することができる。これらのアフィニティー分子としては、AFP、hCG、TSH、FSH、LH、インターロイキン、Fasリガンド、CA19-9、

10

20

30

40

50



C A 1 2 5、P S A、H B s A g、抗H I V抗体、T 4、及び/又は類似物が挙げられる。更に、キャリアー蛋白質と共役したリガンド、核酸と共役したリガンド、細胞内蛋白質、シグナリング分子、及び/又は類似物も挙げられる。本発明で使用されるアフィニティー分子としては、例えば、蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-化学物質相互作用、又は化学物質-化学物質相互作用に応じて目的物質と結合することが可能な性質を有するものが挙げられる。具体的には、抗原-抗体相互作用、糖鎖-レクチン相互作用、酵素-インヒビター相互作用、蛋白質-ペプチド鎖相互作用、染色体もしくは核酸鎖-核酸鎖相互作用、ヌクレオチド-リガンド相互作用又は受容体-リガンド相互作用に基づいて結合するものが挙げられる。上記対における物質の一方が目的物質である場合には、他方はアフィニティー分子である。例えば、目的物質が抗原である場合には、アフィニティー分子は抗体であり、目的物質が抗体である場合には、アフィニティー分子は抗原である（他の上記対についても同様）。アフィニティー分子の具体例は上記分析物と同じである。

10

#### 【0048】

特に、以下のアフィニティー分子、例えば抗体、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>又はF a b ' フラグメント、抗体可変領域、上記レクチン、アビジン、受容体、アフィニティーペプチド、アダマー、及び/又はD N A結合蛋白質を使用することが好ましい。本発明では、上記アフィニティー分子を単独で使用してもよいし、適宜組み合わせで使用してもよい。2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子は他の全アフィニティー分子と異なる目的物質上の位置で目的物質と結合する。検出マーカーで標識された分析物又は検出マーカーで標識された分析物の類似体を使用することにより競合アッセイでアフィニティー分子を使用する場合には、サンプル中の分析物及び標識分析物に対するアフィニティー分子の親和性は同一であることが好ましく、又はサンプル中の分析物及び標識類似体に対するアフィニティー分子の親和性は同一であることが好ましい。

20

#### 【0049】

本発明の上記方法では、アフィニティー分子の濃度は目的物質の検出限界に応じて可変である。通常、アフィニティー分子が反応混合物中の規定検出限界に対応する濃度で分析物と完全に結合することができる濃度よりも高濃度にアフィニティー分子を維持することが望ましい。反応混合物中の濃度は検出限界の2倍以上に維持することが好ましく、5倍以上がより好ましい。2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子の濃度は上記濃度範囲から選択される。

30

#### 【0050】

本発明で使用されるアフィニティー分子は通常、所定の従来検出法により測定（例えば検出）できるものであるか又は検出マーカーで標識することができるものである。このような性質を有する分子を使用することにより、サンプル中の分析物を測定することが可能になる。分析物自体が所定の方法により検出できるもの（例えば酵素等）である場合、又は分析物がアフィニティー分子なしに検出マーカーと直接結合できる場合には、アフィニティー分子が上記のような検出可能な性質を有さない場合でもサンプル中の分析物を測定することができる。所定方法によりそれ自体検出可能な分析物の例としては、酵素、色素、蛍光物質、発光物質、紫外線領域に吸収をもつ物質（例えばD N A）等が挙げられる。2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、全アフィニティー分子がこのような検出可能な性質を有する必要はない。

40

#### 【0051】

アフィニティー分子（又はアフィニティー分子/キャリアー分子のコンジュゲート）を検出マーカーで標識する場合には、検出マーカーとしては、例えば、酵素イムノアッセイ（E I A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、蛍光イムノアッセイ（F I A）、ハイブリダイゼーションアッセイ等の本発明の分野で従来使用されているものが挙げられる。このような物質としては、例えば、アルカリホスファターゼ（A L P）、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ（ $\alpha$ -G a l）、ペルオキシダーゼ（P O D）、マイクロペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ（G O D）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G 6 P D H）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ルシフェラーゼ等の酵素；クーマシーブリリアントブルー

50

R 2 5 0、メチルオレンジ等の色素；<sup>99m</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S等の放射性トレーサー；フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン、又はこれらの誘導体、シアニン型蛍光色素又はオキサジン型蛍光色素〔例えばCyシリーズ色素（Cy 3、Cy 5、及びCy 5.5等：Amersham Biosciences Corp.）、Alexa Fluorシリーズ色素（Alexa Fluor 647、488、594等：Molecular Probes、Inc.）、DYシリーズ色素（DY-630、633、635、640、650、655、656、780、550等：MoBiTec GmbH、Goettingen Germany）、EVOblue（登録商標）30（MoBiTec GmbH、Goettingen Germany）〕等の蛍光色素；希土類蛍光色素〔例えばサマリウム（Sm）、ユーロピウム（Eu）、テルビウム（Tb）又はジスプロシウム（Dy）等の希土類金属と、例えば4,4'-ビス（1",1",1",2",2",3",3"-ヘプタフルオロ-4",6"-ヘキサジオン-6"-イル）クロロスルホ-オ-ターフェニル（BHHCCT）、4,7-ビス（クロロスルホニル）-1,10-フェナントロリン-2,9-ジカルボン酸（BCPDA）、-ナフチルトリフルオロ酢酸（-NTA）等のキレート化合物の組み合わせ等〕；核酸結合蛍光色素；蛍光性タンパク質；ルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス（2,4,6-トリフルオロ-フェニル）オキサレート等の発光色素、発光蛋白質又は粒子；フェノール、ナフトール、アントラセン、又はその誘導体等の紫外線吸収物質；スピンラベル化剤としての性質を有する物質〔例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチル-ピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチル-ピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-t-ブチル-（3,5-ジ-t-ブチル-4-オキソ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン）-p-トリルオキシ等のオキシル基をもつ化合物〕、燐光色素、化学発光化合物、レドックスメディエーター、起電性化合物、金コロイド粒子、又は銀粒子等が挙げられる。

#### 【0052】

上記核酸結合蛍光色素は核酸鎖との結合に応じて強い蛍光を発生する。このような核酸結合蛍光色素としては、例えば、核酸鎖の塩基間に取り込まれる所謂インターカレーター色素〔例えば、アクリジンオレンジ等のアクリジン色素、臭化エチジウム、エチジウムホモダイマー1（EthD-1）、エチジウムホモダイマー2（EthD-2）、臭化エチジウム・モノアジド（EMA）、ジヒドロエチジウム等のエチジウム化合物、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化ヘキシジウム等のヨウ化物化合物、7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）、POPO-1、BOBO-1、YOYO-1、TOTO-1、JOJO-1、POPO-3、LOLO-1、BOBO-3、YOYO-3、TOTO-3等（いずれもMolecular Probesの商品名）のシアニンダイマー色素；PO-PRO-1、BO-PRO-1、YO-PRO-1、TO-PRO-1、JO-PRO-1、PO-PRO-3、LO-PRO-1、BO-PRO-3、YO-PRO-3、TO-PRO-3、TO-PRO-5等（いずれもMolecular Probes Inc.、Eugene、ORの商品名）のシアニンモノマー色素；SYBR Gold、SYBR Green I及びSYBR Green II、SYTOX Green、SYTOX Blue、SYTOX Orange等（いずれもMolecular Probesの商品名）のSYTOX色素〕；DNA二重螺旋のマイナーグループに結合するもの〔例えば、4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール（DAPI：Molecular Probesの商品名）、五水和物（ビス-ベンズイミド）（Hoechst 33258：Molecular Probesの商品名）、三塩酸塩（Hoechst 33342：Molecular Probesの商品名）、ビスベンズイミド色素（Hoechst 34580：Molecular Probesの商品名）等〕；アデニン-チミン配列（A-T）と特異的に結合するもの〔例えば、9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン（ACMA）、ビス-（6-クロロ-2-メトキシ-9-アクリジニル）スペルミン（アクリジンホモダイマー）等のアクリジン色素；例えば、ヒドロキシスチ

ルバミジン等]等が挙げられる。

【0053】

検出マーカーによる分析物又はアフィニティー分子の標識はそれ自体公知のEIA、RIA、FIA、ハイブリダイゼーションアッセイ等[例えば医化学実験講座第8巻,山村雄一編,第1版,中山書店,1971;川生明,図説蛍光抗体法,第1版,ソフトサイエンス社,1983;酵素免疫測定法,石川栄治,河合忠,宮井潔,第3版,医学書院,1987;Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nucleic Acid Res. (1988) 16, 3671, Chu, B. C.ら, Nucleic Acid Res. (1986) 14, 6115, Jablonskiら, Chemistry of Proteins and Crosslinking, Shan S. Wong, (1991) CRC Press、EP1088592A2、EP1061370A2等]で通常使用されている公知標識法や、アビジン(又はストレプトアビジン)とビオチンの反応を利用する通常方法等の当分野で通常使用されている通常方法の任意のものにより実施することができる。

10

【0054】

E. サンプルとアフィニティー分子との接触

分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と接触させるためには、接触段階を実施して分析物とアフィニティー分子の複合体を形成する。このような複合体の作製方法については限定しない。例えば、分析物を含有するサンプルとアフィニティー分子とを例えば水又はtris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファーに夫々溶解、分散又は懸濁して液体材料を得、これらの液体材料を相互に混合接触させればよい。あるいは、サンプルとアフィニティー分子とを同時に溶解、分散又は懸濁してもよい。分析物を含有するサンプルが液体である場合には、アフィニティー分子を直接サンプルと混合することができる。上記のように分析物を含有するサンプルが液体である場合には、例えば水又はバッファーに溶解、分散又は懸濁しなくてもよい。上記方法では、バッファーの濃度は本発明の分野で通常使用される範囲から選択される。

20

【0055】

本発明の方法では、サンプルをアフィニティー分子と接触させるため、換言するならば、分析物とアフィニティー分子との複合体を形成するためのpHと温度は分析物又はアフィニティー分子の性質に依存するので通常規定することは困難である。しかし、複合体の形成を妨げない限り、本発明の分野(例えば公知EIA、RIA、FIA又はハイブリダイゼーションアッセイ)で通常使用されている従来方法に従って条件を選択することができる。即ち、接触(例えば形成)は通常pH約2~10、好ましくはpH5~9で通常0~90、好ましくは5~40の温度で実施することができる。複合体の形成に必要な反応時間は分析物とアフィニティー分子の性質によって異なるので、反応はそれらの性質に応じて数秒間から数時間実施することができる。

30

【0056】

分析物を含有するサンプルと1個以上のコンジュゲートとを接触させる段階も種々の方法で実施することができる。即ち、(i)マイクロフルイディックデバイスを使用せずに独立してサンプルとコンジュゲートとを接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させた後、得られた複合体を含有する溶液をマイクロフルイディックデバイスに添加して複合体を濃縮するか、又は(ii)サンプルとコンジュゲートとをマイクロフルイディックデバイスに添加し、分析物を含有するサンプルと1個以上のコンジュゲートとを接触させる段階と、得られた複合体を濃縮する段階をマイクロフルイディックデバイスで同時に実施する。

40

【0057】

接触段階と濃縮段階を同時に連続的に実施することが好ましく、約0.1~500ミク

50

ロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する濃縮チャンネルに流体的に接続されたチャンネルで分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と、約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスで濃縮技術を使用することにより複合体を濃縮する段階を含む方法により実施するとより好ましい。上記方法では、濃縮チャンネルに流体的に接続されたチャンネルは上記分離チャンネルと同じ特性(材料、形状等)とすることができる。

**【0058】****F. コンジュゲート**

分析物/アフィニティー分子複合体と遊離のアフィニティー分子との分離効率を改善又は増加し、十分な確度で分析物を分析するためには、荷電キャリアー分子と結合したアフィニティー分子(例えばアフィニティー分子と荷電キャリアー分子のコンジュゲート)を上記本発明の方法で使用することができる。即ち、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子/荷電キャリアー分子コンジュゲートと接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させ、少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルを使用することにより、得られた複合体を荷電ポリマーの存在下に未結合のコンジュゲートから分離する。その後、複合体を検出することにより分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定することができる。

**【0059】**

アフィニティー分子(例えば抗体)と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートをアッセイフォーマットで使用する場合には、分子の大きさに従って分離分析するアッセイにおいて高分解能と検出可能なシグナルを提供しながら、本発明の荷電キャリアー分子(例えばDNA又はRNA等の荷電ポリマー)にアフィニティー分子と結合分析物を担持させることができる。コンジュゲートの荷電キャリアー分子は例えば高い分解能と感度を提供し、アフィニティー分子は例えば本発明の移動度シフトアッセイに対する特異性を提供する。荷電キャリアー分子は、電荷対質量比が高く、分子構造の変動が最少であり、分離媒体中で高い分解能を得ることができる。荷電キャリアー分子を使用すると移動度シフトアッセイで多くの利点が得られる。

**【0060】**

非競合アッセイ法では、本発明の荷電キャリアー分子としては、アフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより、分析物の分離(例えば移動)特性に変化を生じさせる分子が挙げられる。

**【0061】**

競合アッセイ法では、本発明の荷電キャリアー分子は必要に応じてアフィニティー分子を介して分析物又は分析物の類似体と結合させることにより使用される。即ち、分析物とアフィニティー分子との複合体の分離を改善するために荷電キャリアー分子と結合した分析物又は分析物の類似体も使用することができる。

**【0062】**

荷電キャリアー分子の使用による分離の改善は例えば、分析物、類似体、アフィニティー分子、荷電キャリアー分子、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート、分析物(又は類似体)とアフィニティー分子との複合体、標識分析物、標識類似体、標識アフィニティー分子、標識コンジュゲート、標識分析物(又は標識類似体)とアフィニティー分子との複合体、及び/又は分析物(又は類似体)と標識アフィニティー分子との複合体を分離する場合に有益である。換言するならば、本発明の荷電キャリアー分子は分析物(又は類似体)と結合して分析物(又は類似体)とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物(又は類似体)とアフィニティー分子(又はその複合体)の分離特性に変化を生じさせ、分析物(又は類似体)とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体の形成に関与しない上記分析物(又は類似体)(例

10

20

30

40

50

えば分析物又は類似体と荷電キャリアー分子の両方を含まないもの)から分析物(又は類似体)とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を分離することが可能な性質を有する。

【0063】

荷電キャリアー分子は正又は負の正味電荷をもつことができ、正味電荷が負荷電キャリアー分子が好ましい。対応する荷電ポリマーと同一型(正又は負)の正味電荷をもつ荷電キャリアー分子を使用することが好ましい。

【0064】

上記特徴をもつ本発明の荷電キャリアー分子は例えばシリカ及びアルミナ等の無機金属酸化物;金、チタン、鉄、及びニッケル等の金属;シランカップリング法等により導入された官能基をもつ無機金属酸化物等;種々の微生物及び真核細胞等の生物;アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等の多糖類;ポリスチレンラテックス、スチレン-ブタジエンコポリマー、スチレン-メタクリレートコポリマー、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレートコポリマー、スチレン-スチレンスルホネートラテックス、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリアクロレイン被覆粒子、架橋ポリアクリロニトリル、アクリル酸又はアクリル酸エステルコポリマー、アクリロニトリル-ブタジエン、塩化ビニル-アクリル酸エステル及びポリ酢酸ビニル-アクリレート等の合成高分子化合物;赤血球、糖類、核酸鎖(例えばDNA, RNA)、ポリペプチド又はその誘導体(例えばスルホン化ポリペプチド)、蛋白質及び脂質等の生体分子等から選択される。正味電荷が負である荷電キャリアー分子は核酸鎖(例えばDNA, RNA)又はスルホン化ポリペプチドが好ましく、DNA又はRNAがより好ましい。正味電荷が正である荷電キャリアー分子はカチオン性ポリマーが好ましい。本発明では、核酸鎖(例えばDNA, RNA)又はスルホン化ポリペプチドを含むアニオン性分子が最も好ましい。DNAは分子が安定しており、当分野で合成及び結合化学実績が豊富であるので特に好ましい。

10

20

【0065】

本発明で使用される核酸鎖はプリン塩基又はピリミジン塩基と、糖部分として五炭糖と、リン酸を含むヌクレオチド残基を基本単位とするものである。各ヌクレオチドはリン酸を介して糖部分の3'及び5'炭素と結合してポリヌクレオチド鎖(例えば、糖部分がリボースであるRNA及び/又は糖部分がデオキシリボースであるDNA)を形成する。核酸鎖は1本鎖でも2本鎖でもそれ以上でもよい。本発明で使用される核酸鎖はそれ自体従来方法で製造することができ、例えば、化学合成、微生物、昆虫、動物、植物等に由来する細胞の抽出精製法、プラスミド、ファージ、コスミド等の適切なベクター遺伝子を導入した上記細胞を使用し、細胞をインキュベートし、増殖したベクターを抽出精製する方法、及びPCR等の遺伝子増殖技術を利用する方法が挙げられる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等)。得られた核酸鎖を化学分解又は制限酵素等の核酸分解酵素で破壊した後に場合により精製し、所望長の核酸鎖を形成させる。本発明では、上記荷電キャリアー分子を単独で使用してもよいし、適宜組み合わせ使用してもよい。

30

40

【0066】

例えば種々のヌクレアーゼ活性に対するヌクレオチドの安定性を強化することが知られている任意種の修飾ヌクレオチドを使用して荷電キャリアー分子を作製することができる。例えば、ヌクレオチドのホスホロチオエート類似体、酸素の代わりにメチレン基をリボース環に含むヌクレオチド、又は2'-糖デオキシ置換基を2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-アルコキシル-及び2'-O-アシル修飾で置換したヌクレオチドを使用することができる。このような修飾は例えばNucleic Acids Res., 1997, 25, 4429-4443, Susan M Freierらに記載されている。

50

## 【0067】

荷電キャリアー分子のサイズは例えば通常、約0.6 kDa ~ 70000 kDa、好ましくは約3 kDa ~ 7000 kDa、より好ましくは約6 kDa ~ 約400 kDaとすることができる。キャリアー分子のサイズは有用な感度と分解能を提供するように例えば分離媒体の型、分離媒体の分離カットオフ、分析物のサイズ、アフィニティー分子のサイズ等に応じて最適化することができる。特に核酸鎖を荷電キャリアー分子として使用する場合には、核酸鎖の長さは本発明の目的を達成できる限り、通常約1 bp ~ 100000 bp、好ましくは5 bp ~ 10000 bp、より好ましくは10 bp ~ 1000 bp、最も好ましくは10 bp ~ 500 bpとすることができる。本発明で使用される核酸鎖は本発明の目的を達成する範囲内で適切な基で適宜修飾することができる。

10

## 【0068】

本発明において、荷電キャリアー分子とアフィニティー分子との結合は、上記のような検出マーカによる分析物又はアフィニティー分子の標識と同様に実施することができる。例えば、荷電キャリアー分子をアフィニティー分子と結合するには、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子の夫々の官能基を利用して直接又はリンカー〔例えば、4-(p-マレイミドフェニル)酪酸スルホスクシンイミジル(スルホ-SMPB)、4-(N-マレイミドメチル)シクロ-ヘキサン-1-カルボン酸スルホスクシンイミジル(スルホ-SMCC)、N-(マレイミド-カプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)等〕を介して実施することができる。結合は例えば公知EIA、RIA、FIA又はハイブリダイゼーションアッセイ〔例えば医化学実験講座第8巻、山村雄一編、第1版、中山書店、1971；川生明著、図説蛍光抗体法、第1版、ソフトサイエンス社、1983；Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等、EP1088592A2、EP1061370A2等〕で利用されているそれ自体公知の標識法や、アビジン(又はストレプトアビジン)とビオチンの反応を利用する従来方法等の当分野で通常使用されている従来方法で実施することができる。

20

## 【0069】

反応性官能基を荷電キャリアー分子に予め導入した後、反応性官能基を含む荷電キャリアー分子にアフィニティー分子を上記結合方法で結合することができる。特に、核酸鎖を荷電キャリアー分子として使用する場合には、反応性官能基を核酸鎖に導入するには、それ自体公知の方法に従って実施することができる。例えば、縮合剤〔例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、塩酸塩(WSC)等〕の存在下に反応性官能基をもつ化合物(例えばN-トリ-フルオロアセチルアミノアルキルアミン等のアミノ基をもつ化合物、シスタミン等のチオール基をもつ化合物、N-ビオチニルアミノアルキルアミン等のビオチンをもつ化合物、マレイミドアルキルアミン等のマレイミド基をもつ化合物等)を使用してホスホアミダイト結合を形成させることにより、核酸の末端に位置する5'三リン酸基に反応性官能基を導入する方法〔Nucleic Acid Res. (1988) 16, 3671, Chu, B. C.ら〕；縮合剤〔例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、塩酸塩(WSC)等〕の存在下に反応性官能基をもつ化合物(例えばN-トリフルオロアセチルアミノアルキルカルボン酸等のアミノ基をもつ化合物、N-ビオチニルアミノアルキル-カルボン酸等のビオチンをもつ化合物、マレイミドアルキルカルボン酸等のマレイミド基をもつ化合物等)を使用して、エステル結合を形成させることにより、核酸の末端に位置する3'ヒドロキシル基に反応性官能基を導入するか、その活性エステル体を直接反応させる方法〔Nucleic Acid Res. (1986) 14, 6115, Jablonskiら〕；制限酵素で切断したフラグメントのアミノ含有塩基(アデニン、シトシン)が1本鎖として突出している末端(突出末端、付着端)にアミノ反応性リンカーを導入する方法〔Chemistry of Proteins and Crosslink 30

30

40

50

ing, Shan S. Wong, (1991) CRC Press]; 反応性官能基をもつヌクレオチドモノマーを、平滑化酵素(T4 DNAポリメラーゼ, DNA平滑化酵素等)により、1本鎖突出末端を形成する制限酵素で切断したフラグメントに組込む方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等); ハイブリダイゼーションを利用し、1本鎖突出末端を形成する制限酵素で切断したフラグメントの1本鎖部分に対して相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドの5'末端に反応性官能基を導入し、制限酵素で切断したフラグメントの1本鎖突出末端にハイブリダイズさせる方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等); PCRを利用し、5'末端に反応性官能基を導入したPCRプライマーをPCRで使用し、5'末端に反応性官能基を導入した核酸鎖をPCR産物として得る方法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等)が挙げられる。こうして、反応性官能基を核酸の末端に導入することができる。1本鎖核酸を使用する場合には、本核酸鎖の5'末端に相補的な配列と5'末端に導入された反応性官能基をもつオリゴヌクレオチドを1本鎖核酸にハイブリダイズさせる方法により、反応性官能基が導入された核酸鎖を作製することもできる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press等)。上記のような反応性官能基としては、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲン化アルキル基、イソチオシアネート基、アビジン基、ビオチン基、カルボキシル基、ケトン基、マレイミド基、活性エステル基、スルホン酸ハライド基、カルボン酸ハライド基、アミノ基、スルホン酸基、ピイリジルジオ基、アルデヒド基等が挙げられる。

#### 【0070】

アフィニティー分子と結合させる核酸鎖の数が不均一の場合には、形成される複合体に存在する核酸鎖の数も不均一になり、複合体の分離が不特定になる。従って、アフィニティー分子と結合させる核酸鎖の数を均一することが好ましい。同じ理由で、核酸鎖1分子と結合するアフィニティー分子の数も1分子にすると適切である。

#### 【0071】

上記結合方法において、核酸鎖がその両末端にアフィニティー分子を結合することができる官能基を有する場合には、核酸鎖を予め酵素的又は化学的に分解して反応性官能基を一方の末端に導入した後にアフィニティー分子と結合させることができる。あるいは、核酸鎖をアフィニティー分子と結合させ、アフィニティー分子を両末端に結合した中間体を生成し、中間体と結合する核酸鎖を酵素的又は化学的に分解し、アフィニティー分子を核酸の一方の末端に結合した生成物を得る。

#### 【0072】

結合化学を使用してアフィニティー分子を荷電キャリアー分子と結合させ、本発明のコンジュゲートを形成させることができる。結合化学はアミノ基、チオール、カルボキシル基、イミダゾール基、スクシンイミド基等との反応を利用することができる。例えばアミン基をもつように修飾したヌクレオチドを含むDNAキャリアーを溶液中でアフィニティー分子及び両末端NH<sub>2</sub>リンカーと混合することにより、DNAをアフィニティー分子と架橋することができる。アフィニティー分子をキャリアー分子と結合又は会合又は相互作用させるための他の技術は先にその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込んだ日本特許出願第W002/082083号「電気泳動法」に詳細に開示されている。

#### 【0073】

本発明で使用されるアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートは抗体、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 又はF a b ' フラグメント、抗体可変領域、レクチン、アビジン、受容体、アフィニティーペプチド、アプタマー、及びDNA結合蛋白質からなる群から選択される少なくとも1個のアフィニティー分子と、核酸鎖(例えばDNA, RNA)、カチオン性ポリマー及びスルホン化ポリペプチドからなる群から選択される少なくとも1個の荷電キャリアー分子とのコンジュゲートが好ましい。抗体、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 又はF a b ' フラグメント、抗体可変領域及びアフィニティーペプチドからなる群から選択される少なくとも1個のアフィニティー分子と、核酸鎖(例えばDNA, RNA)及びスルホン化ポリペプチドからなる群から選択される少なくとも1個の荷電キャリアー分子とのコンジュゲートがより好ましく、更に、抗体、F a b又はF a b ' フラグメントから選択される少なくとも1個のアフィニティー分子と、荷電キャリアー分子として核酸鎖、特にDNAのコンジュゲートが最も好ましい。

10

**【0074】**

本発明では、上記コンジュゲートを単独又は適宜組み合わせて使用することができる。2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子は他の全アフィニティー分子と異なる目的物質上の位置で目的物質と結合する。

**【0075】**

上記方法では、コンジュゲートの濃度は目的物質の検出限界によって可変であるので通常、規定することは困難である。しかし、コンジュゲートが反応混合物中の規定検出限界に対応する濃度で分析物と完全に結合することができる濃度よりも高濃度にコンジュゲートを維持することが望ましい。反応混合物中の濃度は検出限界の2倍以上に維持することが好ましく、5倍以上がより好ましい。2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、各コンジュゲートの濃度は上記濃度範囲から選択される。

20

**【0076】**

このようなコンジュゲートは通常、所定の方法により測定(例えば検出)できるものであるか又は検出マーカーで標識することができるものである。即ち、コンジュゲートのアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の少なくとも一方は通常、所定の方法により測定できるものであるか又は検出マーカーで標識することができるものである。このような性質を有するコンジュゲートを使用すると、サンプル中の分析物を測定し易くなる。分析物自体が所定の方法により検出できるもの(例えば酵素等)である場合、又は分析物がアフィニティー分子なしに検出マーカーと直接結合できる場合には、コンジュゲートが上記のような検出可能な性質を有さない場合でもサンプル中の分析物を測定することができる。2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、全コンジュゲートがこのような性質を有する必要はない。

30

**【0077】**

検出マーカーは上記の通りであり、検出マーカーによるコンジュゲート(例えばアフィニティー分子及び/又は荷電キャリアー分子)の標識は上記のような検出マーカーによる分析物もしくはアフィニティー分子の標識又は荷電キャリアー分子とアフィニティー分子の結合と同様に実施することができる。

**【0078】**

特に、核酸鎖を荷電キャリアー分子とするコンジュゲートの場合には、直接又はリンカー[例えばスルホ-SMPB、スルホ-SMCC、EMCS、NHS等]もしくは核酸(標識される核酸鎖と異なるものをアフィニティー分子と結合させる;以下、「リンカー核酸鎖」と言う)、ペプチド、蛋白質、糖等(以下、「リンカー物質」と言う)を介してマーカーを核酸鎖と結合させることができる。リンカー物質を介して核酸鎖をマーカーと結合させる場合には、核酸鎖とリンカー物質との結合又はリンカー物質とマーカーとの結合は核酸鎖とアフィニティー分子との結合又はマーカーによるコンジュゲートの標識と同様に実施することができる。

40

**【0079】**

あるいは、リンカー化学を使用して検出マーカーをポリマーに共有結合することもでき

50



る。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)末端基を有する脂肪族鎖等のリンカーを含む修飾ヌクレオチドを使用して荷電キャリアー分子としてのDNAを合成することができる。フルオレセインアミン等の検出マーカ―はマーカ―アミン基上のNHSによる求核攻撃後にポリマーと共有結合することができる。場合により、修飾ヌクレオチドはマーカ―に結合したリンカー基により攻撃することができるアミン等のリンカー反応性基を含むことができる。コンジュゲ―を検出マーカ―で標識又は結合又は会合又は相互作用させるための他の技術は先にその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込んだ日本特許出願第W002/082083号「電気泳動法」に詳細に開示されている。

#### 【0080】

リンカー物質を介してマーカ―による核酸鎖の標識を実施するには、マーカ―で予め標識されたリンカー物質を核酸鎖と結合させてもよいし、あるいはリンカー物質を核酸鎖と結合させた後にマーカ―と結合させてもよいし、あるいは核酸鎖とリンカー物質とマーカ―を同時に結合させてもよい。更に、本発明では、マーカ―による核酸鎖の標識は使用するマーカ―に応じて分析物/コンジュゲ―(核酸鎖)/マーカ―の複合体の形成前又は形成と同時に又は形成後のいずれに実施してもよい。この修飾に制限はない。特に、予めマーカ―で標識されたリンカー物質に核酸鎖を結合させることが好ましい。

#### 【0081】

例えば、ビオチンを核酸鎖に結合させた後に、予めマーカ―で標識されたアビジン(又はストレプトアビジン)に結合させる。こうして、マーカ―の量の制御下に核酸鎖を容易に標識することができる。別の場合には、例えば、ビオチンをまず核酸鎖に結合させた後に、予めアビジン(又はストレプトアビジン)を介してビオチンと結合させたマーカ―で標識されたリンカー物質(例えばリンカー核酸鎖等)に結合させる。こうして、マーカ―の量の制御下に核酸鎖を容易に標識することができる。更に、アビジン(又はストレプトアビジン)1分子はビオチン4分子を結合させることができるので、測定感度を上げるために標識リンカー3分子を結合させることが可能である。

#### 【0082】

核酸と結合する蛍光色素をマーカ―として使用するには次のように実施することができる。従来方法(例えばHandbook of Fluorescent Probe and Research Chemicals, 7th edition, Chapter 8; Molecular Probes Inc.に記載されているような方法)に従い、例えば水又はハイブリダイゼーションアッセイ又はイムノアッセイの分野で通常使用されているバッファー溶液(例えば、tris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等)中にて適切な温度で適切な時間にわたってマーカ―を核酸鎖[荷電キャリアー分子(核酸鎖)/アフィニティー分子コンジュゲ―又は分析物と荷電キャリアー分子/アフィニティー分子コンジュゲ―の複合体における核酸鎖を含む]と接触させる。上記方法では、核酸鎖とマーカ―の接触は核酸鎖、分析物を含有するサンプル、荷電キャリアー分子(核酸鎖)/アフィニティー分子コンジュゲ―、マーカ―、荷電キャリアー分子(核酸鎖)/アフィニティー分子コンジュゲ―とマーカ―の複合体等を水又は上記のようなバッファーに直接溶解又は分散又は懸濁するか、あるいは各成分を水又は上記のようなバッファーに溶解又は分散又は懸濁して液体材料とした後に混合して相互に接触させることにより実施することができる。

#### 【0083】

本発明において、分析物を含有するサンプルを荷電キャリアー分子とアフィニティー分子のコンジュゲ―に接触させる段階は、上記のような分析物を含有するサンプルとアフィニティー分子の接触と同様に実施することができる。反応条件(例えばpH、温度、反応時間等)はサンプルとアフィニティー分子の上記接触条件と同じである。

#### 【0084】

G. アフィニティー分子とコンジュゲ―の使用

分析物 / アフィニティー分子複合体と遊離のアフィニティー分子との分離効率を更に改善又は増加し、分析物検出の分解能を高めるためには、アフィニティー分子及び荷電キャリアー分子と結合したアフィニティー分子（例えばアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート）を上記本発明の方法で使用することができる。即ち、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子とアフィニティー分子 / 荷電キャリアー分子コンジュゲートに接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの複合体を形成させ、少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルを使用することにより、得られた複合体を荷電ポリマーの存在下に未結合のアフィニティー分子及び / 又はコンジュゲートから分離する。その後、複合体を検出することにより分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定することができる。

10

**【0085】**

本発明では、2個以上のアフィニティー分子と2個以上のコンジュゲートを使用することができる。この場合には、各アフィニティー分子（各コンジュゲートのアフィニティー分子を含む）は他の全アフィニティー分子と異なる目的物質上の位置で目的物質と結合する。

**【0086】**

アフィニティー分子とコンジュゲートの両者を使用する場合には、アフィニティー分子とコンジュゲートの少なくとも一方は通常、所定従来方法により測定（例えば検出）できるものであるか又は検出マーカーで標識することができるものである。このような性質を有するアフィニティー分子又はコンジュゲートを使用すると、サンプル中の分析物を測定し易くなる。分析物自体が所定方法により検出できるもの（例えば酵素等）である場合、又は分析物がアフィニティー分子もしくはコンジュゲートなしに検出マーカーと直接結合できる場合には、アフィニティー分子とコンジュゲートが上記のような検出可能な性質を有さない場合でもサンプル中の分析物を測定することができる。2個以上のアフィニティー分子又は2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、全アフィニティー分子又は全コンジュゲートがこのような性質を有する必要はない。上記方法において、検出マーカー、検出マーカーによるアフィニティー分子又はコンジュゲートの標識等は上記の通りである。分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子とコンジュゲートに接触させて分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの複合体を形成させる方法に関して制限はない。例えば、分析物を含有するサンプルとアフィニティー分子とコンジュゲートとを例えば水又はtris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファーに夫々溶解、分散又は懸濁して液体材料を得、これらの液体材料を相互に混合接触させればよい。あるいは、サンプルとアフィニティー分子とコンジュゲートとを同時に溶解、分散又は懸濁してもよい。分析物を含有するサンプルが液体である場合には、アフィニティー分子及び / 又はコンジュゲートを直接サンプルと混合することができる。上記のように分析物を含有するサンプルが液体である場合には、例えば水又はバッファーに溶解、分散又は懸濁しなくてもよい。

20

30

**【0087】**

上記方法において、バッファーの濃度は本分野で通常使用されている範囲から選択される。サンプルをアフィニティー分子とコンジュゲートに接触させる段階におけるアフィニティー分子とコンジュゲートの濃度については上記の通りである。反応条件（例えばpH、温度、反応時間等）はサンプルとアフィニティー分子の上記接触条件と同一である。

40

**【0088】****H. 分離操作**

得られた目的物質とアフィニティー物質との複合体（例えば分析物 / アフィニティー分子複合体、分析物 / コンジュゲート複合体又は分析物 / アフィニティー分子 / コンジュゲート複合体）を複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質（例えばアフィニティー分子及び / 又はコンジュゲート）から分離する。複合体と遊離のアフィニティー物質を移動速度の差に基づいて分離することが可能な分離法を適用することができる。この分

50

離では、例えば、本分野で使用されている従来方法である所謂B/F分離法を使用することができる。具体例としては、電気泳動（例えば等電点電気泳動、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミド電気泳動）、誘電泳動等の電気を利用する電氣的分離法、カラム分析法（例えばゲル濾過カラム分析、イオン交換カラム分析、アフィニティーカラム分析）、マススペクトル質量分析、吸着法、ミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）等が挙げられる。特に、等電点電気泳動、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミド電気泳動等の電気泳動又は誘電泳動等の電氣的分離法を使用するのが好ましい。より具体的には、効率的冷却条件下と高電圧下に高分離効率で実施できることからキャピラリー電気泳動又は誘電泳動を使用することが好ましい。

10

## 【0089】

更に、特にマイクロフルイディックデバイス及びシステムを使用して分離を行う場合には、対象分析物がサンプル中に非常に低濃度で非常に少量しか存在しない場合が多い。分析物の量はマイクロフルイディック分析システムの検出閾値又はその付近又はそれ以下まで低下することが多い。従って、場合により、対象分析物の検出感度を上げるために（上記及び下記に記載するような）1種以上のオンラインサンプル濃縮又はサンプルスタッキング操作をマイクロフルイディックデバイスで使用する事が好ましい。本発明の方法の実施に使用することができるオンラインサンプル濃縮技術の特に有用な1例は、その開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むEveraerts, F. M., Geurts, M., Mikkers, F. E. P., Verheggen, T. P. E. M. J. C. Chromatogr. 1976, 119, 129-155; Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 293-315; 及びMikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 317-332に記載されているような等速電気泳動法（ITP）である。ITPでは、通常夫々十分に高い電気泳動移動度と十分に低い電気泳動移動度をもつリーディング電解液とターミナル電解液の間にサンプルを挿入する。しかし、リーディング電解液とターミナル電解液を他の組み合わせでサンプルプラグの前又は後に配置することもできる。例えばHirokawa, T., Okamoto, H., Ikuta, N., and Gas, B., "Optimization of Operational Modes for Transient Isotachophoresis Preconcentration-CZE," Analytical Sciences 2001, Vol. 17 Supplement 1185参照。周知の移動境界原理(moving boundary principles)に従って最終的に定常状態構成に達し、全サンプルゾーンは同一速度で移動する。各移動ゾーンにおけるサンプル濃度はリーディング電解液の濃度に対して自己調節される。本発明では、ITPを下記実施例2におけるサンプル濃縮法として使用してAFPアッセイを実施し、Poly(dI-dC)を使用して血清干渉を除去した。本発明の方法の実施に使用可能なITP以外のキャピラリー電気泳動で使用される他のサンプル濃縮技術は多種多様なものがあり、電場増幅サンプルスタッキング（FASS）や固相抽出法（SPE）が挙げられる。例えば、同時マルチポート圧力及び界面動電流体制御(electrokinetic fluid control)を使用したマイクロフルイディックチップでのFASSはその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む米国特許出願第10/206,386号“Microfluidic Methods, Devices and Systems for In Situ Material Concentration”に記載されている。更に、他の最近開発された種々のサンプル濃縮法も本発明の方法の実施に使用することができ、例えばリーディング/ターミナル電解液のpHを変化させてサンプルスタッキング領域を形成する方法（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むWeiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C. E. Electrophoresis 2001, 22, 59-65; Britz-McKibbin, P., Bebauld, G. M., Chen, D. D. Y. Anal Chem. 20

20

30

40

50

00, 72, 1729-1735参照)及び/又は温度勾配の存在下で溶液バルク流に対して分析物の電気泳動速度を平衡させる方法(例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むRoss, D., Locascio, L. E. Anal Chem. 2002, 71, 5137-5145参照)が挙げられる。本発明では、上記のような分離法で従来使用されている全てのバッファー、充填剤、処理溶液等の各種試薬等を利用することができる。これらの材料の濃度は場合により公知分離法に従って選択することができる。分離条件(例えばpH、温度、印加電圧、時間等)は公知方法に従って適宜選択することができる。

#### 【0090】

##### I. マイクロフルイディックデバイス

本発明では、目的物質とアフィニティー物質との複合体(例えば分析物/アフィニティー分子複合体、分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体)を複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)から分離するには、通常マイクロフルイディックデバイスと上記分離法に基づく検出器を含むマイクロフルイディックシステムを使用することにより実施することができる。本発明の方法はマイクロフルイディックデバイスでの適用に好適である。最少容量の試薬とサンプルを使用して迅速で正確な移動度シフトアッセイのためにサンプルをマイクロフルイディックデバイスに導入することができる。サンプルとアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)の混合物を低塩バッファーに導入することができ、他方、分離媒体中のバッファーはより高感度とより良好な分解能が得られるようにサンプルポールの先端にアッセイ混合物成分を蓄積する「スタッキング」効果を提供するように塩濃度を高くする。例えば迅速スクリーニング、データ獲得及びデータ解析のためにサンプルライブラリーチップ又はマルチウェルプレート(例えば標準96、384又は他のより大型のマルチウェルプレート)からマイクロフルイディックデバイス(例えばチップ)にサンプルを吸引( SHIPPING )することにより、高スループットスクリーニングフォーマットでサンプルをスクリーニングすることができる。マイクロフルイディックデバイスは、例えば分離媒体を含み、流出液が検出器によりモニターされる検出チャンネル領域又は別個の検出チャンネルに流入する、1個以上の分離チャンネルを有することができる。本発明のマイクロフルイディックデバイスは例えばサンプル中の分離された成分を検出するための検出器を含むことができる。このよう

10

20

30

#### 【0091】

本発明で使用されるマイクロフルイディックデバイスは、通常約0.1~約500µmの少なくとも1個の横断面寸法を有する、少なくとも1個のフルイディックコンポーネント(例えばチャンネル、チャンパー、ウェル等)を包含及び/又は収容する本体構造を有し、これらのチャンネル及び/又はチャンパーは多くの場合には約0.1µm~200µm、場合により約0.1µm~100µm、多くの場合には約0.1µm~20µmの少なくとも1個の横断面寸法を有する。このような横断面寸法としては、例えば幅、深さ、高さ、直径等が挙げられる。通常、これらの寸法を有する構造を「マイクロスケール」とも言う。本発明のマイクロフルイディックデバイスは通常単一本体構造の内側に配置された少なくとも1個、好ましくは2個以上のチャンネル及び/又はチャンパーを含む。このようなチャンネル/チャンパーは個々に分離していてもよいし、あるいは、流体的に接続されていてもよい。このような流体的接続はチャンネル、チャンネル交点、バルブ等により提供することができる。チャンネル交点は多数のフォーマットで存在することができ、十字交点、「T」字交点、又は2本のチャンネルを流体連通させる多数の他の構造が挙げられる。

40

#### 【0092】

本明細書に記載するマイクロフルイディックデバイスの本体構造は通常適切に組み合わせ又は組み立てると例えば本明細書に記載するチャンネル及び/又はチャンパーを含む本発明のマイクロフルイディックデバイスを形成する2個以上の別個のコンポーネントの集合

50

からなる。通常、本明細書に記載するマイクロフルイディックデバイスは基板層の集合として製造される。特に、このような好適デバイスは上部部分と下部部分と内部部分からなり、内部部分は実質的にデバイスのチャンネルとチャンバーを規定する。種々の基板材料を下部部分として利用することができる。通常、デバイスは微細加工されるので、基板材料は公知の微細加工技術（例えばフォトリソグラフィ、ウェットケミカルエッチング、レーザーアブレーション、エアアブレーション技術、射出成形、エンボシング、及び他の技術）との適合性に基づいて選択される。基板材料は通常マイクロフルイディックデバイスを暴露させる可能性のある全条件（例えばpH、温度、塩濃度、及び電場印加限界）との適合性も考慮して選択される。従って、所定好適側面では、基板材料としては通常このような微細加工技術が定期的に利用される半導体産業に通常関連する材料（例えばガラス、石英、シリコン又はポリシリコン等のシリカ基板や、ガリウムヒ素等の他の基板材料）が挙げられる。半導体材料の場合には、多くの場合に絶縁コーティング又は層（例えば酸化ケイ素）を基板材料上に設けることが望ましく、特に電場をデバイス又はその内容物に印加する用途では望ましい。

10

#### 【0093】

好適付加側面では、基板材料はポリマー材料からなり、例えばポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン（TEFLON（登録商標））、ポリ塩化ビニル（PVC）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスルホン、ポリスチレン、ポリメチレンペンテン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ弗化ビニリデン、ABS（アクリロニトリル-ブタジエン-スチレンコポリマー）等のプラスチックが挙げられる。このようなポリマー基板は上記のような利用可能な微細加工技術を使用するか、又は射出成形、エンボシング又はスタンピング等の周知成形技術を使用して微細加工原型から容易に製造される。このようなポリマー基板材料は製造し易く、低コストで処分し易く、最も極端な反応条件にも一般に耐性であるので好ましい。更に、これらのポリマー材料は、マイクロフルイディックシステムでの効用を強化するため、例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む米国特許第5,885,470号に記載されているように、例えば流体の流れを向上させるために処理表面（例えば誘導体化又は被覆表面）を含むことができる。

20

#### 【0094】

本発明のマイクロフルイディックシステムは検出器を含むことが好ましい。分離チャンネルからの溶出をモニターする検出器は遊離のアフィニティー物質（例えば遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲート）が検出器に到達する前にアフィニティー物質/目的物質複合体（例えばアフィニティー分子/分析物複合体、コンジュゲート/分析物複合体又はアフィニティー分子/コンジュゲート/分析物複合体）の溶出を検出することができる。Agilent DNA 500 Lab Chip（登録商標）等のマイクロフルイディックデバイスは高い感度と分解能で複数のサンプルを迅速に分析することができる。

30

#### 【0095】

検出器は分離チャンネルの分離媒体からの溶出に伴って遊離のアフィニティー物質及び/又はアフィニティー物質/分析物複合体を検出するように配置することができる。アフィニティー物質（例えばコンジュゲート）は修飾せずに検出することもできるし、検出感度を増すために検出マーカをアフィニティー物質（例えばコンジュゲート）に結合させてもよい。アフィニティー物質（例えばコンジュゲート）は、例えばその特徴的吸光度特性により検出可能なポリマー等の所定荷電キャリアー分子を含むことができる。例えば、荷電キャリアー分子としてのDNAは分離媒体からの溶出に伴ってスペクトロフォトメーターにより検出することができる、約260nmに強い吸収をもつものである。

40

#### 【0096】

検出器は例えば検出可能なピークの溶出をモニターするように分離チャンネルの流出端に配置することができる。場合により、検出器は分離された複合体と遊離のアフィニティー物質（例えば遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲート）の相対位置を

50

検出するようにポリアクリルアミドゲル等の分離媒体を走査することができる。検出器は検出マーカに適した任意型とすることができ、吸光度検出器、蛍光検出器、蛍光偏光検出器、スペクトロフォトメーター、ホスホイメージャー、電圧計、シンチレーションカウンター、屈折計、及び/又は類似物が挙げられる。このような検出器は分析物を同定及び/又は定量するために解析可能なデジタル又はアナログ出力シグナルを発生させることができる。

**【0097】**

検出器出力の経時的解析を使用して例えば分析物の存在を判定及び/又はサンプル中に存在する分析物の量を定量することができる。保持時間、移動速度、ピーク高、ピーク位置、及びピーク比等のピークパラメーターを解析し、分析物の存在を同定及び/又はサンプル中の分析物の量を定量することができる。参照サンプル、標準サンプルの使用、及び回帰分析等の標準分析技術を利用して分析結果を解析することができる。

10

**【0098】**

DNA 500 LabChipを使用するAgilent Bioanalyzer 2100等の本発明のマイクロフルイディックシステム及びデバイス(例えばマイクロフルイディックチップ)は少量のサンプル添加量で迅速に高分解能で分離することができる。図2に示すように、マイクロフルイディックデバイス20は例えば流量制御マイクロチャンネルを介して接続されたサンプルウェル及び/又は試薬ウェル21をもつことができる。本発明のデバイスは例えばブロッカーポリマーとアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)用のウェルと、マルチウェルプレート23からサンプルを分注するためのシッパーキャピラリーチューブ22を備えるマイクロフルイディックチップから構成することができる。チップは例えばアッセイ成分を混合するための合流マイクロチャンネルと、反応時間を経過させるためのインキュベーションチャンネル24と、分離媒体を充填した分離チャンネル25を含むことができる。流量制御システムはウェルからの荷電ポリマーとシッパーからのサンプルを合流マイクロチャンネルに通して直接接触させた後にアフィニティー物質ウェルからのアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)と混合することができる。十分な時間インキュベーションチャンネルを流れた後に、処理済みサンプルを例えばポリ-N, N-ジメチルアクリルアミド(pDMA)バッファの分離媒体に添加し、遊離のアフィニティー物質(例えば遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲート)をアフィニティー物質/分析物複合体(例えばアフィニティー分子/分析物複合体, コンジュゲート/分析物複合体又はアフィニティー分子/分析物/コンジュゲート複合体)から分離する。遊離アフィニティー物質は最初に分離チャンネルから排出され、アフィニティー物質/分析物複合体の前に検出することができる。蛍光検出器等の検出器26は分離チャンネルから流出するバッファをモニターし、蛍光標識アフィニティー物質を高感度で検出し、出力シグナルを論理回路に送ることができる。分離からの情報を解析し、分析物(例えばアフィニティー物質/分析物複合体)の存在を同定及び/又は分析物の量を定量することができる。

20

30

**【0099】**

このようなマイクロフルイディックデバイスに従って、種々の送液法が場合により使用される。例えば、好ましい1側面では、所望されるチャンネルに圧力差を加えることによりデバイスのチャンネルに液の流れを誘導する。これはチャンネルの一端に正圧又は他端に負圧を加えることにより実施することができる。複雑なチャンネルネットワークでは、例えば所与チャンネルにおける流れを停止及び開始するようにデバイス構造内にバルブ等を挿入することにより各相互接続チャンネルの全部で流速を制御することができる。あるいは、単一圧力差、例えば単一チャンネルポートに真空を印加する場合にも各チャンネルを流れる材料移動速度、タイミング及び/又は容量を制御するようにチャンネル抵抗を調節することができる。このようなチャンネルネットワークの例は例えばいずれもその開示内容全体を全目的で参考資料として本明細書に組込む米国特許出願第09/238,467号(出願日1999年1月28日)及び09/233,700号(出願日1999年1月19日)及び09/277,367号(出願日1999年3月26日)に示されている。

40

50

## 【0100】

あるいは、本発明のマイクロフルイディック適用に制御電動輸送システム(controlled electrokinetic transport systems)を使用してもよい。この型の電動輸送(electrokinetic transport)はその開示内容全体を全目的で参考資料として本明細書に組込む米国特許第5,858,195号(Ramsey)に詳細に記載されている。このような電動材料輸送導入システム(electrokinetic material transport and direction system)としては、構造に印加された電場内の荷電種の電気泳動移動度に依存するシステムが挙げられる。このようなシステムは特に電気泳動材料輸送システム(electrophoretic material transport systems)と呼ばれる。他の電動材料導入輸送システム(electrokinetic material direction and transport systems)はチャンネル又はチャンパー構造に電場を印加することによりこれらの構造の内側に生じる流体及び材料の電気浸透流に依存する。要約すると、エッチングにより作製されたガラスチャンネル又はガラスマイクロキャピラリーにおいて荷電官能基(例えばヒドロキシル基)を表面にもつチャンネルに流体を配置すると、これらの基はイオン化することができる。ヒドロキシル官能基の場合には、例えば中性pHでこのイオン化が生じる結果、表面から流体内部へプロトンが放出され、流体/表面界面の近傍にプロトンが集積するか又はチャンネル内のバルク流体の周囲に正荷電シースが形成される。チャンネルの長手方向に電圧勾配を印加すると、プロトンシースは電圧降下の方向、即ち負電極に向かって移動する。

10

## 【0101】

本明細書で使用する「制御電動材料輸送導入(controlled electrokinetic material transport and direction)」とは、上記のような電動システムを意味し、多重即ち3個以上の電極に印加される電圧の能動制御を利用するシステムである。換言するならば、このような制御電動システムは少なくとも2本の交差チャンネルに印加される電圧勾配を同時に制御する。特に、本明細書に記載する好適マイクロフルイディックデバイス及びシステムは少なくとも2本の交差チャンネル又は流体導管(例えば相互に接続した閉鎖チャンパー)を含む本体構造を含み、前記チャンネルは少なくとも3個の非交差末端を含む。2本のチャンネルの交点とは2本以上のチャンネルが相互に流体連通する点を意味し、「T」交点、十字交点、多重チャンネルの「車輪」交点、又は2本以上のチャンネルがこのように流体連通している他の任意チャンネル配置を含む。チャンネルの非交差末端はチャンネルが例えば「T」交点等の別のチャンネルと交差していない末端の点である。好ましい側面では、デバイスは少なくとも4個の非交差末端をもつ少なくとも3本の交差チャンネルを含む。1本の水平チャンネルが1本の垂直チャンネルと十字交差する基本的十字チャンネル構造では、制御電動材料輸送(controlled electrokinetic material transport)は他のチャンネルからの拘束流(constraining flow)を交点に提供することにより、交点を通して材料流(flow of material)を制御しながら導入するように機能する。例えば、垂直チャンネルとの交点を例えば左から右に横断するように水平チャンネルを通して第1の材料を輸送することが望ましいと仮定する。交点を通るこの材料の単純な電動材料流は水平チャンネルの長手方向に電圧勾配を印加すること、即ち第1の電圧をこのチャンネルの左端に印加し、この電圧よりも低い第2の電圧をこのチャンネルの右端に印加するか、又は右端を浮動させる(電圧を印加しない)ことにより得られる。しかし、使用される媒体中を輸送される材料が本来拡散性であることと交点における対流効果により、交点を通るこの型の材料流の結果として実質的量の拡散が生じる。

20

30

40

## 【0102】

制御電動材料輸送(controlled electrokinetic material transport)では、交点を通して輸送される材料をサイドチャンネル(例えば上下チャンネル)からの低レベル流により拘束する。これは例えば垂直チャンネルの上又は下端から右端に向かう材料流の経路に沿って小さい電圧勾配を印加することにより得られる。その結果、材料流が交点で「ピンチング」され、材料が垂直チャンネルに拡散するのを防ぐ。その後、垂直チャンネルの長手方向即ち上端から下端に向かって電圧勾配を印加することにより、交点にピンチされた材料容量を垂直チャンネルに注入することができる。この注入中に水平チャンネルから材料が流出するのを

50

避けるために、低レベル流をサイドチャンネルに逆流させ、材料を交点から「プルバック」させる。

#### 【0103】

ピンチ注入スキームに加え、制御電動材料輸送(controlled electrokinetic material transport)は機械的部分又は可動部を含まない仮想バルブを形成するために容易に利用される。具体的に、上記十字交点について説明すると、あるチャンネルセグメントから別のセグメント(例えば水平チャンネルの左アームから右アーム)に向かう材料流(flow of material)は垂直チャンネルから(例えば垂直チャンネルの下アームから上アームへ)の制御流により効率的に制御、停止及び再開することができる。具体的に、「オフ」モードでは、左端と上端の間に電圧勾配を印加することにより、材料は左アームから交点を通って上アームに輸送される。この経路に沿って(下端から上端に向かって)同様の電圧勾配を印加することにより、下アームから上アームに向かって拘束流(constraining flow)が導入される。次に、左から上に向かう印加電圧勾配を左から右へと転換することにより、計量材料が水平チャンネルの左アームから右アームに分配される。こうして分配される材料の量は時間量と印加電圧勾配に依存する。4方向十字交点に関して例証の目的で記載したが、これらの制御電動材料輸送システム(controlled electrokinetic material transport system)はより複雑な相互接続チャンネルネットワーク(例えば相互接続並列チャンネルのアレー)にも容易に応用することができる。

10

#### 【0104】

分離媒体を通るアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)移動が電気泳動のように電圧電位により誘導される場合には、十分な分解能を維持しながら感度を改善するために低塩バッファーに多量の添加量を添加することができる。サンプルが低濃度の分析物しか含有していない場合又は混合物を高度に希釈処理する場合には、移動度シフト分析で感度を良好にするために多量のサンプルを分離媒体にロードすることが望ましい。しかし、多量のサンプルは幅広の分解不良なピークとして溶出する幅広のボラスとして分離媒体に侵入する可能性がある。この問題は、低塩バッファーにサンプルを添加し、塩濃度の高いランニングバッファー中で電気泳動を実施することにより低減することができる。低塩サンプルは電気泳動電流に対して荷電キャリアが比較的不足しているので、荷電サンプル成分は迅速に移動してサンプルボラスの先端に蓄積する。荷電サンプル成分は荷電キャリアの豊富な高塩ランニングバッファーに到達すると、サンプルボラスの先端でシャープなバンドとして蓄積する。こうして、分解能を実質的に低下させずにより強力なピークが検出がされるように多量の希釈サンプルを電気泳動分離媒体に添加することができる。

20

30

#### 【0105】

システムの検出器は対象シグナルに適した任意デバイスを含むことができる。アフィニティー物質が有用な光吸収スペクトルをもつ場合には、検出器はスペクトロフォトメーターとすることができる。アフィニティー物質が検出マーカを結合している場合には、検出器はマーカに適した型とすることができる。例えば、蛍光マーカには蛍光計、放射性マーカにはシンチレーションカウンター、化学発光マーカにはフォトダイオード管等を使用できる。ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離を実施する場合には、検出器は例えば遊離のアフィニティー物質及び/又はアフィニティー物質/分析物複合体バンドのゲル移動の程度を検出するスキナーを含むことができる。クロマトグラフィー又はキャピラリー電気泳動により分離を実施する場合には、検出器は例えば時間と共に溶出するにつれて遊離のアフィニティー物質及び/又はアフィニティー物質/分析物複合体を検出するために分離媒体からの流出液流に焦点をあてる適切な検出器とすることができる。このような検出器は本発明の論理回路により解析することができるアナログ又はデジタル出力シグナルを発生することができる。

40

#### 【0106】

デバイスの論理回路は、例えば時間と共に変化するゲル位置又はクロマトグラフィー流出液内で検出されるアフィニティー物質の量を表す、例えば検出器からの定量的シグナル

50



を受信することができる。論理回路はシグナル振幅を移動チャート紙にプロットするチャートレコーダーのように単純なものでもよいし、高性能デジタルコンピューター/ソフトウェアシステムでもよい。Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer - Biosizing [DNA 7500]等の通常入手可能なソフトウェアは分析物を同定及び定量するために、例えばピーク同定、ピーク高、ピーク面積積分、バックグラウンドサブトラクション、回帰分析を実現することができる。

【0107】

J. 分離媒体

本発明では、上記マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルのモレキュラーシーブ効果を有するポリマー等の分離媒体を使用し、分離媒体により分離を行うことが好ましい。本発明の分野で従来使用されているものであれば、分離チャンネルに充填される分離媒体（例えば充填剤）は特に制限されない。

10

【0108】

具体的には、遊離のアフィニティー物質と分析物/アフィニティー物質複合体の分離は例えばマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルに配置した分離媒体でキャピラリーゲル電気泳動により実施すると好ましい。キャピラリーゲル電気泳動では、分離媒体は例えば小分子を自由に流動させながら大分子の流動を阻止することができる線状又は架橋ポリマーの制限マトリックスである。

【0109】

このような分離媒体としては、例えばポリエチレンオキシド（PEO）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレンオキシド等のポリエーテル類；ポリエチレンイミン等のポリアルキレンイミン類；ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリアクリル酸メチル等のポリアクリル酸型ポリマー；ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリ-n, n-ジメチルアクリルアミド（pDMA）等のポリアミド型ポリマー；ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸エステル、ポリメタクリル酸メチル等のポリメタクリル酸型ポリマー；ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリビニルオキサゾリドン等のポリビニル型ポリマー；プルラン、エルシナン、キサントラン、デキストラン、グアーガム、アガロースゲル等の水溶性ヒドロキシルポリマー；メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）、ヒドロキシプロピルセルロース等の水溶性セルロース；スクロースとエピクロロヒドリンのコポリマー〔例えばFicoll（商品名、Pharmacia）〕等の水溶性コポリマー；及びそれらの誘導体、並びにそれらのポリマーを構成する複数種のモノマー単位を含むコポリマーが挙げられる。分離媒体は単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。特に、ポリアクリルアミドゲル、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレンオキシド（PEO）、スクロースとエピクロロヒドリンのコポリマー（Ficoll）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）、ポリ-N, N-ジメチルアクリルアミド（pDMA）、アガロースゲルが好ましい。ポリ-N, N-ジメチルアクリルアミド（pDMA）が最も好ましい。

20

30

【0110】

このような媒体をマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルに充填すると、例えば迅速な高スループット分離を行うことができる。本発明では、上記分離媒体を使用せずに、水又はバッファーのみを使用して分離を実施することもできる。

40

【0111】

上記分離媒体の分子量は、通常約500Da~6,000kDa、好ましくは1~1,000kDa、より好ましくは100~1,000kDaである。上記のように使用される分離媒体の濃度は場合により本発明の分野で通常使用されている範囲内で選択され、即ち、通常は約0.01~40%（w/v）、好ましくは0.01~20%（w/v）、より好ましくは0.1~10%（w/v）である。通常は、マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルの内側に上記分離媒体をバッファーと共に充填する。

【0112】

50

本発明の方法の実施に使用可能なバッファの種類は特に制限されない。例えば、使用されるバッファとしては、ハイブリダイゼーションアッセイ、イムノアッセイ等の分野で使用されているものの多くが挙げられ、例えば、tris-バッファ、リン酸バッファ、ベロナールバッファ、硼酸バッファ、グッドバッファ、SSCバッファ、TBEバッファ、TAEバッファ等が挙げられる。これらのバッファは、通常は約0.1 mM ~ 10 M、好ましくは1 mM ~ 5 M、より好ましくは5 mM ~ 1 Mの濃度で使用することができる。バッファのpHは物質分離に悪影響を与えない任意範囲とすることができ、通常は約2 ~ 13、好ましくは4 ~ 11、より好ましくは5 ~ 9である。このようなパラメータは所望により電場増幅スタッキングを行うように最適化することができる。上記分離媒体をバッファに添加すると、バッファの粘度は通常は約2 ~ 1、000センチポアズ、好ましくは5 ~ 200センチポアズ、より好ましくは10 ~ 100センチポアズになる。

10

## 【0113】

分離は例えばサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により実施することもできる。SEC樹脂はアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)を受容するには十分大きい、アフィニティー物質/分析物複合体(例えばアフィニティー分子/分析物複合体、コンジュゲート/分析物複合体又はアフィニティー分子/分析物/コンジュゲート複合体)を受容するほどには大きくない細孔をもつことができる。混合物をSEC樹脂カラムに加圧導入(ポンピング)すると、アフィニティー物質/分析物複合体は樹脂の外側の容積内のみを流れ、遊離のアフィニティー物質は外側容積と内側樹脂容積をよりゆっくと流れる。

20

## 【0114】

## K. 検出

分析物/アフィニティー物質複合体(例えば分析物/アフィニティー分子複合体、分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体)又は上記分離法で分離される複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質(例えば遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲート)は該当分子の検出可能な性質の特性に対応する方法(例えば結合した検出マーカー)により測定又は検出することができる。こうして、サンプル中の分析物を測定するか又はサンプル中の分析物の存在を同定することができる。即ち、上記分離法に従って、分析物/アフィニティー分子複合体を複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー分子から分離するか、分析物/コンジュゲート複合体を複合体の形成に関与しない遊離のコンジュゲートから分離するか、又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体を複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー分子及び/又はコンジュゲートから分離する。得られた複合体、又は遊離のアフィニティー分子及び/又は遊離のコンジュゲートをこれらの特性に対応する方法(例えば検出マーカー)により測定又は検出することができる。従って、短時間に高感度でサンプル中の分析物の量を測定するか又はサンプル中の分析物の存在を同定することができる。

30

## 【0115】

本発明の数種の特定態様を図3A ~ 3Fに示す。本発明を実施してサンプル中の対象分析物を検出するためには当分野で公知の種々の免疫化学アッセイ技術を使用することができ、例えば抗体サンドイッチアッセイや酵素イムノアッセイ(イムノアッセイの一般論については例えばBoltonら, Handbook of Experimental Immunology, Weir, D.M., Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1986, vol. 1, Chapter 26参照)、及び当業者に公知の他の同様のアッセイフォーマットが挙げられる。例えば、上述のように例えば図3Aに示すようなアッセイフォーマットを使用し、分析物32と、標識荷電キャリアー分子36(例えば1個以上の蛍光タグを付けた蛍光標識DNA分子)と結合(例えば共役)したアフィニティー分子34(例えば抗体又は抗原)を含む対応するコンジュゲート31を含む複合体30を遊離の(未結合の)抗体/荷電キ

40

50

キャリアー分子コンジュゲート 31 から分離することができる（図面では便宜と分かり易くするために、分離段階を記号「/」で表す）。あるいは、図 3 B ~ F に示すようにサンドイッチイムノアッセイフォーマットを実施することもでき、蛍光標識抗体 / 分析物複合体等のタグ付き（例えば標識）結合成分（分子） / 分析物複合体は別の結合成分（分子）（例えば標識又は非標識抗体又は DNA - 抗体コンジュゲート）と結合して検出可能となる。

【 0 1 1 6 】

サンドイッチイムノアッセイの第 1 の例を図 3 B に模式的に示し、抗原 / 標識抗体 31 複合体と別のアフィニティー分子（例えば抗体 39）の結合を示す。対象分析物 32 を含有するサンプルを標識コンジュゲート 31 と共にプレインキュベートし、結合部分 / 分析物複合体を形成させることが好ましい。図 3 C は第 2 の抗体 39 が蛍光ラベルを含み、DNA - 抗体コンジュゲート 31 を標識しないサンドイッチイムノアッセイフォーマットを示す。図 3 D ~ F は 2 個（以上）の DNA - 抗体コンジュゲート 31, 31' を使用する場合（図 3 D）と、第 3 の標識又は非標識アフィニティー分子 39 も使用する場合（図 3 E ~ F）のサンドイッチイムノアッセイフォーマットを示す。図 3 B ~ F に示すように 2 個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、例えば各アフィニティー分子は通常、他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合する。

【 0 1 1 7 】

上記図 3 A ~ 3 F では、コンジュゲート 31 及び 31'、標識コンジュゲート 31、アフィニティー分子 39 並びに標識アフィニティー分子 39 の各々の 1、2、又は 3 個以上を本発明の方法の実施に使用することができる。サンドイッチアッセイフォーマットを利用するアッセイの非限定的な具体例を以下に挙げる。（a）サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、（i）少なくとも 1 個を検出マーカで標識された 1 個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識されたアフィニティー分子とを含む複合体を形成させる段階と；（ii）マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に関与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子から複合体を分離する段階と；（iii）分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；（iv）測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；アフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有するものである。

【 0 1 1 8 】

（b）サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、（i）アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との 1 個以上のコンジュゲートの少なくとも 1 個が検出マーカで標識された、前記 1 個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を形成させる段階と；（ii）マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体に関与しない検出マーカで標識されたコンジュゲートから複合体を分離する段階と；（iii）分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；（iv）測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2 個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。換言するならば、荷電キャリアー分子は分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせ、アフィニティー分子を

介して分析物と結合して分析物と検出マーカで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を形成することにより、分析物と検出マーカで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を複合体に關与しない検出マーカで標識されたコンジュゲートから分離させる。

【0119】

(c) サンプル中の分析物の測定又は同定方法が開示され、(i) アフィニティー分子の少なくとも1個又はコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカで標識されたものであり、1個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとを含む複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に複合体の形成に關与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子又は検出マーカで標識されたコンジュゲートから複合体を分離する段階と；(iii) 分離された複合体の量を測定するか又は分離された複合体の存在を検出する段階と；(iv) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するか又は検出された存在に基づいてサンプル中の分析物の存在を同定する段階を含み；アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。換言するならば、荷電キャリアー分子は分析物の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせ、アフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとを含む複合体を形成することにより、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとを含む複合体を複合体に關与しない検出マーカで標識された遊離のアフィニティー分子又は検出マーカで標識された遊離のコンジュゲートから分離させる。

10

20

【0120】

あるいは、サンプル中の分析物は、標識分析物又は荷電キャリアー分子と結合した分析物（又は分析物の標識類似体もしくは荷電キャリアー分子と結合した分析物類似体）を標識分析物又は荷電キャリアー分子と結合した分析物（又は分析物の標識類似体もしくは荷電キャリアー分子と結合した分析物類似体）とサンプル中の分析物の競合反応に使用する所謂競合アッセイにより測定することもできる。

30

【0121】

競合アッセイでは、アフィニティー分子はサンプル中の分析物及び標識分析物（又は標識類似体）と結合することが可能な性質を有するものである。2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものである。更に、分析物がサンプル中に蛋白質又は他の結合物質と結合した形態（例えば結合形態）及び蛋白質又は他の結合物質と結合していない形態（例えば未結合形態）の両方で存在し、結合形態と未結合形態が平衡している場合には、分析物の類似体を使用する競合アッセイを使用して分析物の未結合形態を分析することができる。

40

【0122】

競合アッセイフォーマットを使用する本発明の他の態様の具体例を図3G～3Kに示す。例えば図3G～Jに示す態様では、標識分析物又は分析物の標識類似体（例えば分析物32'）が抗体又はDNA-抗体コンジュゲート（例えばDNA-抗体コンジュゲート31及び/又は31'）等の1個以上の非標識アフィニティー分子との結合についてサンプル中の対象分析物32と競合する競合アッセイを使用することができる。例えば図3H～3Iに示すように分子の大きさに基づいて分離分析するアッセイで検出可能なシグナルの

50

分解能を高めることが望ましいか又は必要である場合には、多重アフィニティー分子を使用することができる。例えば図3Kに示すような別の態様では、荷電キャリアー分子（例えば核酸鎖）と結合した分析物又は分析物類似体（例えば分析物32'）が抗体（例えば標識抗体39）等の1個以上の標識アフィニティー分子との結合についてサンプル中の対象分析物32と競合する競合アッセイを使用することができる。上記図3G~3Kでは、コンジュゲート31及び31'、アフィニティー分子39並びに標識アフィニティー分子39の1、2又は3個以上を本発明の方法の実施に使用することができる。

#### 【0123】

上記本発明の方法において、分析物の類似体を使用することにより分析物の未結合形態を測定する場合には、分析物の類似体は分析物と結合して結合形態を形成する蛋白質又は他の結合物質と実質的に反応しないことが好ましい。図3Kの標識アフィニティー分子は少なくとも未結合形態の分析物及び類似体と結合するものである。標識アフィニティー分子は未結合形態の分析物及び類似体と結合し、結合形態の分析物と結合しないものが好ましい。

10

#### 【0124】

競合アッセイフォーマットを使用することにより実施されるアッセイの具体例を以下に挙げる。(a) サンプル中の分析物の測定方法が開示され、(i) 検出マーカで標識された分析物（又は類似体）と1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティー分子との第1の複合体及び標識分析物（又は標識類似体）とアフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第2の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物（又は遊離の標識類似体）から第2の複合体を分離する段階と；(iii) 分離された第2の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物（もしくは分離された遊離の標識類似体）の量を測定する段階と；(iv) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものである。サンプル中の分析物及び標識分析物に対するアフィニティー分子の親和性は同じであることが好ましく、又はサンプル中の分析物及び標識類似体に対するアフィニティー分子の親和性は同じであることが好ましい。本発明の上記方法において、分析物の類似体を使用することにより分析物の未結合形態を分析する場合には、分析物の類似体は分析物と結合して結合形態を形成する蛋白質又は他の結合物質に対して実質的に非反応性である必要がある。

20

30

#### 【0125】

(b) サンプル中の分析物の測定方法が開示され、(i) 検出マーカで標識された分析物（又は類似体）及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの第1の複合体及び標識分析物（又は標識類似体）とコンジュゲートとの第2の複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第2の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物（又は遊離の標識類似体）から第2の複合体を分離する段階と；(iii) 分離された第2の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物（もしくは分離された遊離の標識類似体）の量を測定する段階と；(iv) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィ

40

50

ニティ-分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティ-分子が他の全アフィニティ-分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリア-分子がアフィニティ-分子を介して標識分析物（又は標識類似体）と結合して標識分析物（又は標識類似体）とアフィニティ-分子と荷電キャリア-分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。換言するならば、荷電キャリア-分子は標識分析物（又は標識類似体）の分離（例えば移動）特性に変化を生じさせ、アフィニティ-分子を介して標識分析物（又は標識類似体）と結合して標識分析物（又は標識類似体）とコン

10

【0126】

（c）サンプル中の分析物の測定方法が開示され、（i）検出マーカーで標識された分析物（又は類似体）、1個以上のアフィニティ-分子及びアフィニティ-分子と荷電キャリア-分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、サンプル中の分析物とアフィニティ-分子とコンジュゲートとの第1の複合体及び標識分析物（又は標識類似体）とアフィニティ-分子とコンジュゲートとの第2の複合体を形成させる段階と；（ii）マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第2の複合体の形成に関与しない遊離の標識分析物（又は遊離の標識類似体）から第2の複合体を分離する段階と；（iii）分離された第2の複合体の量又は分離された遊離の標識分析物（もしくは分離された遊離の標識類似体）の量を測定する段階と；（iv）測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティ-分子及びコンジュゲートのアフィニティ-分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサ

20

30

40

## 【0127】

(d) サンプル中の分析物の測定方法が開示され、(i) 荷電キャリアー分子と結合した分析物(又は荷電キャリアー分子と結合した類似体)と検出マーカで標識された1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、荷電キャリアー分子と結合した分析物(又は荷電キャリアー分子と結合した類似体)と標識アフィニティー分子との第1の複合体及びサンプル中の分析物と標識アフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルで荷電ポリマーの存在下に第1の複合体を第2の複合体から分離する段階と；(iii) 分離された第1の複合体の量又は第2の複合体の量を測定する段階と；(iv) 測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定する段階を含み；アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物又はサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した分析物上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した類似体上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子が分析物(又は類似体)と結合して分析物(又は類似体)とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより第1の複合体の分離(例えば移動)特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。換言するならば、荷電キャリアー分子は標識分析物(又は標識類似体)の分離(例えば移動)特性に変化を生じさせ、標識分析物(又は標識類似体)と結合して荷電キャリアー分子と結合した分析物(又は荷電キャリアー分子と結合した類似体)と標識アフィニティー分子との第1の複合体を形成することにより、荷電キャリアー分子と結合していない分析物(又は類似体)と標識アフィニティー分子との複合体を分析物と標識アフィニティー分子との第2の複合体から分離させる。上記本発明の方法では、荷電キャリアー分子と分析物又は分析物の類似体の結合は上述したような荷電キャリアー分子とアフィニティー分子の結合と同様に実施することができる。本発明の上記方法において、分析物の類似体を使用することにより分析物の未結合形態を分析する場合には、分析物の類似体は分析物と結合して結合形態を形成する蛋白質又は他の結合物質に対して実質的に非反応性である必要がある。標識アフィニティー分子は少なくとも未結合形態の分析物及び類似体と結合する。標識アフィニティー分子は未結合形態の分析物及び類似体と結合するが、結合形態の分析物とは結合しないことが好ましい。上記測定段階(iii)で標識アフィニティー分子が結合形態の分析物、未結合形態の分析物及び類似体と結合する場合には、分離された第1の複合体の量又は第2の複合体、遊離の標識アフィニティー分子、及び結合形態の分析物と標識アフィニティー分子の複合体の合計量を測定する。

## 【0128】

本発明で使用される上記分析物の類似体は分析物がアフィニティー分子に結合するのと同様にアフィニティー分子と結合可能な性質を有するものである。即ち、類似体はアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートと相互作用する分析物の官能基と機能的に同じ官能基(例えば結合サイト)をその構造に含むものである。検出マーカ及び/又は荷電キャリアー分子を類似体分子に導入した場合、アフィニティー分子との相互作用の点で類似体構造中のこのような基の機能を妨げてはならない。本発明における類似体としては、目的物質の構造の一部を修飾、改変、変性又は除去したものが挙げられる。このような類似体としては、例えば目的物質の蛋白質の一部に変異を導入した組換え蛋白質、目的物質のペプチド配列の一部を修飾又は改変したペプチド、目的物質の核酸配列の一部を修飾又は改変した核酸等が挙げられる。

## 【0129】

上記の場合に未結合形態の分析物を分析するためには、対象分析物(例えば目的物質)

はサンプル中に蛋白質又は他の結合物質と結合した形態（例えば結合形態）及び蛋白質又は他の結合物質と結合していない形態（例えば未結合形態）の両者で存在し、結合形態と未結合形態が平衡しているものとする。このような分析物としては、例えばT4、コルチゾール、プロゲステロン、エストラジオール、テストステロン、PSA、プロテインC、エラスターゼ、カテプシンG、トロンビン、 $C_1$ -エステラーゼ、プラスミン、組織型プラスミノゲンアクチベーター等が挙げられる。目的物質に対する親和性と目的物質と結合することが可能な性質をもつものであれば、結合形態の蛋白質又は他の結合物質に特に制限はない。これらの蛋白質又は他の結合物質としては、例えば対象分析物（目的物質）がT4の場合にはグロブリン、プレアルブミン又はアルブミンが挙げられ、コルチゾール、プロゲステロン、エストラジオール又はテストステロンの場合にはグロブリン又はアルブミンが挙げられ、PSAの場合には $\alpha_1$ -アンチキモトリプシン又は $\alpha_2$ -マクログロブリンが挙げられ、プロテインCの場合にはプロテインCインヒビターが挙げられ、エラスターゼの場合には $\alpha_1$ -トリプシンインヒビターが挙げられ、カテプシンGの場合には $\alpha_1$ -アンチキモトリプシンが挙げられ、トロンビンの場合にはアンチトロンビンIIIが挙げられ、 $C_1$ -エステラーゼの場合には $C_1$ インヒビターが挙げられ、プラスミンの場合には $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターが挙げられ、組織型プラスミノゲンアクチベーターの場合にはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1等が挙げられる。

10

#### 【0130】

上記方法で分離された複合体の検出マーカー又は複合体の形成に関与しない検出マーカーの測定量に基づいてサンプル中の分析物の量を決定するには、例えば既知濃度の分析物を含む別のサンプルを使用して上記と同じ測定を行い、得られた分析物の量と分離された複合体の検出マーカー又は複合体の形成に関与しない検出マーカーの量の関係を示す検量線を作成する。分析物を含むサンプルの測定により得られた検出マーカーの測定値をこの検量線に適応させ、目的分析物の量を決定する。

20

#### 【0131】

更に、既知濃度の内部標準として検出可能な物質をサンプルに添加した後に、内部標準として添加した物質の量を分離された複合体の検出マーカー又は複合体の形成に関与しない検出マーカーの量と比較することによりサンプルに含まれる分析物の相対量を計算することができる。こうして、複数のデバイスの使用の間での誤差を修正することが可能になる。

30

#### 【0132】

本発明の方法では、分離された複合体の検出マーカー又は複合体の形成に関与しない検出マーカーの量の測定は使用する検出マーカーの型に応じた従来方法により実施することができる。例えば、マーカーの性質が酵素活性に依存する場合には、測定は例えば「酵素免疫測定法」蛋白質、核酸、酵素、別冊第31巻，北川常廣，南原利夫，辻章夫，石川栄治編，51-63頁，共立出版，1987年9月10日出版に記載されているような従来方式のRIA又はハイブリダイゼーションで実施することができる。分析物が放射性物質である場合には、放射性物質により発生される放射線の種類と強度に応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、ウェル型シンチレーションカウンター等の適切な検出器を使用して従来方式のRIA又はハイブリダイゼーションにより検出することができる〔医化学実験講座第8巻，山村雄一編，第1版，中山書店，1971；生化学実験講座2，トレーサー実験法 下，竹村彰祐，本庶佑，501-525頁，東京化学同人，1977年2月25日出版参照〕。マーカーの性質が蛍光に依存する場合には、図説蛍光抗体法，川生明，第1版，ソフトサイエンス社，1983；生化学実験講座2，核酸の化学III，実吉峯郎，299-318頁，東京化学同人，1977年12月15日出版に記載されているように蛍光光度計や共焦点レーザー顕微鏡等の検出器を使用して従来方式のFIA又はハイブリダイゼーションで測定を行うことができる。マーカーの性質が蛍光に依存する場合には、例えば「酵素免疫測定法」蛋白質、核酸、酵素、別冊第31巻，北川常廣，南原利夫，辻章夫，石川栄治編，252-263頁，共立出版，1987年9月10日出版に記載の方法に従ってフォトンカウンター等の検出器を使用して従来通り

40

50



に測定を実施することができる。更に、性質が紫外線領域に吸収をもつ場合には、分光光度計等の検出器を使用して従来通りに検出を行うことができる。性質が発色性の場合には、分光光度計や顕微鏡等の検出器を使用して従来通りに検出を行うことができる。更に、分析物がスピン性の場合には、例えば「酵素免疫測定法」蛋白質、核酸、酵素、別冊第31巻、北川常廣、南原利夫、辻章夫、石川栄治編、264-271頁、共立出版、1987年9月10日出版に記載の方法に従って電子スピン共鳴装置等の検出器を使用して従来通りに検出を行うことができる。検出は蛍光偏光により行うこともできる。

#### 【0133】

本発明の測定又は同定方法は荷電ポリマーの存在下で分離を行う付加段階、好ましくは分離段階とサンプル(目的物質)とアフィニティー物質とを接触させて複合体を形成させる段階の両方を実施する付加段階を除き、それ自体公知の従来方法で適正に選択した試薬を使用してそれ自体公知の上記方法により実施することができる。

10

#### 【0134】

サンプル中の分析物の存在は例えば標識アフィニティー分子の移動度シフト、アフィニティー分子の標識コンジュゲートの移動度シフト、標識分析物又はその標識類似体及び/又は対応するアフィニティー分子とのその複合体の移動度シフト、あるいは標識分析物又はその標識類似体及び/又はアフィニティー分子の対応するコンジュゲートとのその複合体の移動度シフト、あるいはそれらの組み合わせを検出することにより同定することができる。荷電キャリアー分子と結合した分析物と、対応するアフィニティー分子との複合体の移動度シフトや、荷電キャリアー分子と結合した分析物の類似体と、対応する標識アフィニティー分子との複合体の移動度シフトを使用して分析物の存在を同定することもできる。分析物を含有しない陰性対照サンプルの分析をアッセイで実施し、このような標識分子及び/又はその複合体ピーク溶出時間又は分離媒体移動速度を測定することができる。検出可能な量の参照分析物を含有する陽性対照サンプルをアッセイで試験し、標識分子及び/又はその複合体ピーク溶出時間又は分離媒体移動速度を測定することができる。未知サンプルを同一アッセイで試験する場合には、標識分子及び/又はその複合体ピークと同一の保持時間又は移動速度のピークの検出により分析物の存在を同定することができる。同定したピークがアッセイのバックグラウンドノイズにならないようにするためには、標準法バリデーション技術を使用してバックグラウンドを上回る実シグナルが検出されているという統計的信頼を与えるピーク高又はピーク面積の閾値を決定するとよい。

20

30

#### 【0135】

各サンプルに内部マーカーを添加し、ピーク同定用参照枠を提供するか又はアッセイ内変動性に合わせて溶出時間を調節し、アッセイ間での厳密な比較を実現することができる。例えば、検出可能な高分子量マーカーと低分子量マーカーをサンプルに添加し、コンジュゲートピークを参照枠内に区分することができる。溶出時間が分析間で変動する場合には、当業者に公知のように内部マーカー間のその相対位置によりコンジュゲートピークを同定することもできる。

#### 【0136】

サンプル中に存在する分析物の量は同定したコンジュゲート/分析物複合体のピーク高又はピーク面積を標準曲線と比較することにより決定することができる。標準曲線は例えば既知量の分析物を有する1個以上の標準サンプルのピーク高又は面積値を表す計算式とすることができる。未知サンプルからのピーク高又は面積値を式に入力し、サンプル中の分析物の量を決定することができる。ピーク高又は面積値は測定確度を増すように陰性対照バックグラウンドを差し引くことにより調節することができる。

40

#### 【0137】

分析物は遊離のコンジュゲートと複合体のピークのピーク高比又はピーク面積比を値の式又はチャートに相関させることにより定量することができる。分析物濃度に対する濃度の式又はチャートは当分野で公知のように、計算することもできるし、アッセイに合わせて経験的に導くこともできる。内部マーカーを添加すると、既知量の分析物でアッセイの各分析から得られた結果と比較することにより定量データを改善することができる。

50

## 【0138】

本発明の方法の実施において、核酸鎖を使用し、DNアーゼ、RNアーゼ等のヌクレアーゼが存在する可能性がある場合には、核酸鎖を含有する溶液にエチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)四酢酸(EGTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヘパリン等のヌクレアーゼインヒビターを添加すると適切である。

## 【0139】

要約すると、核酸鎖を別の物質(例えばサンプル、アフィニティー分子又はコンジュゲート)と接触させる場合又は分析物/アフィニティー物質複合体を複合体の形成に参与しない遊離のアフィニティー物質から分離する場合には、阻害剤の存在下で接触を行うために核酸鎖を含有する溶液又は核酸鎖と接触させる溶液に上記のような阻害剤を添加すると適切である。 10

## 【0140】

本発明を実施するために使用される試薬及び他の材料は本発明の上記方法を首尾よく実施できるように、荷電キャリアー分子とアフィニティー分子との遊離のコンジュゲートと、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの複合体を分離するための組成物又はキットにすることができる。具体的には、本発明の荷電キャリアー分子とアフィニティー分子との遊離のコンジュゲートと、サンプル中の分析物とコンジュゲートとの複合体を分離するための組成物又はキットは分離媒体と荷電ポリマーを含むものである。上記組成物又はキットの好適態様では、コンジュゲートは検出マーカで標識されたものである。コンジュゲートの荷電キャリアー分子を検出マーカで標識したものがより好ましい。本発明の上記組成物又はキットは更にアフィニティー分子を含むものである。この場合、アフィニティー分子とコンジュゲート(例えばコンジュゲートのアフィニティー分子及び/又は荷電キャリアー分子)の少なくとも一方は検出マーカで標識されているのが好ましい。各成分の例の好適態様は上述した通りである。上記組成物又はキットはマイクロフルイディックデバイスと組み合わせて用いることができ、デバイスをキットの一部として販売してもよい。 20

## 【0141】

## III. 濃縮法

本発明では、濃縮方法は、マイクロフルイディックデバイスを使用することによりサンプル中の目的物質(例えば対象分析物)を濃縮し、高濃度の濃縮目的物質(例えば対象分析物)を移動度シフトアッセイに適用する目的で実施される。所謂オンラインサンプル濃縮技術等の種々の濃縮法をマイクロフルイディックデバイスで使用してサンプル中の目的物質を濃縮することができる。オンラインサンプル濃縮ないしサンプルスタッキング操作は(i)キャピラリーでサンプル成分の電気泳動移動度の差を利用する電気泳動濃縮法(例えばFASS, FASI, ITP, IF等)と(ii)吸着剤を利用する化学吸着濃縮法(例えばSPE等)の2種類に分類することができる(その開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むR. L. Chien, Electrophoresis, 24, 486-497, 2003)。 30

## 【0142】

例えば、以下の濃縮法を使用することができる。(i)濃縮ドメインと分離ドメインの電気伝導率の差を利用するFASS(Field Amplification Sample Stacking: 電場増幅サンプルスタッキング法)(例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む米国特許出願第10/206,386号“Microfluidic Methods, Devices and Systems for In Situ Material Concentration”, Weiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C. E. Electrophoresis 2001, 22, 59-65; Britz-McKibbin, P., Bebaul t, G. M., Chen, D. D. Y. Anal Chem. 2000, 72, 1729-1735, Ross, D., Locascio, L. E. Anal Chem. 2002, 74, 5137-5145)、(ii)FASSで濃縮ドメインと分離ドメインの間 40 50

に微小水プラグを挿入するFASI (Field Amplification Sample Injection: 電場増幅サンプル注入法) (例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む“Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis”, Chien, R. L. & J. Chromatogr. 1991, 559, 141-148)、(iii)リーディング溶液とトレーリング溶液の間に挟まれたドメインにおけるイオンの移動度の差を利用するITP (Isotachopheresis: 等速電気泳動法) (例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むEveraerts, F. M., Geurts, M. Mikkers, F. E. P., Verheggen, T. P. E. M. J. Chromatogr. 1976, 119, 129-155; Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 293-315; 及びMikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. J. Chromatogr. 1979, 168, 317-332, Hirokawa, T., Okamoto, H., Ikuta, N., and Gas, B., “Optimization of Operational Modes for Transient Isotachopheresis Preconcentration-CZE,” Analytical Sciences 2001, Vol. 17 Supplement 1185)、(iv)物質間の等電点の差を利用するIF (Isoelectric Focusing: 等電点電気泳動法) (例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む“High performance isoelectric focusing using capillary electrophoresis instrumentation”, Wehr T. & Am. Biotechnol. Lab. 1990, 8, 22, “Fast sand high-resolution analysis of human serum transferring by high-performance isoelectric focusing in capillaries”, Kilar F. & Electrophoresis 1989, 10, 23-29)、及び(v)固相(例えば受容体等の吸着剤を結合させた固相)と目的物質間の特異的相互作用を利用して目的物質を固相に吸着させるSPE (Solid Phase Extraction: 固相抽出法) (例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む“Microchip-based purification of DNA from Biological Samples”, Breadmore M. & Anal. Chem. 2003, 75, 1880-1886)。

#### 【0143】

##### IV. 本発明の濃縮法

本発明は上記の公知濃縮法では効率的に濃縮されなかった目的物質を高濃度で濃縮し、目的物質と同時に濃縮されるサンプル中の分析物以外の不要成分(例えば目的物質の検出を妨げる「ノイズ成分」)による(例えば分離及び検出段階における)目的操作の干渉を低減することによって目的物質を高感度で検出する方法を提供する。更に、本発明は目的物質の高感度測定のために目的物質を容易に濃縮できるように反応条件を最適化するための方法も提供する。

#### 【0144】

本発明の1つの特徴は上記濃縮法においてサンプル中の目的物質を荷電キャリアー分子と結合したアフィニティー分子(例えばアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート)に接触(例えば反応)させることにより形成された目的物質とコンジュゲートとの複合体又は目的物質とコンジュゲートとアフィニティー分子との複合体を濃縮する点にある。即ち、本発明の濃縮法は以下の問題を解決するために実施される。a) サンプル中の目的物質が非常に大きな分子量及び/又は低い電荷を有する場合には、目的物質の電気泳動移動度は遅くなる(例えば低下する)。その結果、このような目的物質を短時

間で高度に濃縮することは困難であり、例えばこのような物質を効率的に濃縮することは困難になる。b) サンプル中の目的物質以外の不要成分(例えばノイズ成分)が目的物質と同じ領域に移動すると、不要成分は目的物質と同時に濃縮される。その結果、目的物質を含有する濃縮サンプルを分離及び検出用サンプルとして使用すると、バックグラウンド及びノイズレベルが上昇し、アッセイ感度が低下する(例えばアッセイ感度が低下する)。c) 臨床血清サンプルの場合のようにサンプル中に目的物質がノイズ成分と共存する場合には、目的物質が濃縮され且つ不要ノイズ成分が目的物質と同時に濃縮されないか又は目的物質と別の領域で濃縮されるように反応条件を最適化することは非常に困難である(例えばこの場合には、高感度検出には濃縮段階の最適化が非常に重要である。しかし、このような最適条件を見いだすには非常に時間と労力がかかる)。

10

## 【0145】

そこで、本発明の方法は非常に大きな分子量及び/又は比較的低い電荷を有する目的物質を効率的に高濃度に濃縮することができると共に、不要成分(例えばノイズ成分)の濃度が低いかもしくは約ゼロである移動領域、又は不要ノイズ成分が存在しない移動領域で(例えばノイズ成分の濃度が低い移動領域)適切な荷電キャリア分子を選択すると共に目的物質を濃縮するための反応条件を最適化することによって、目的物質の移動度を調節することにより目的物質を濃縮することができる荷電キャリア分子(例えばアフィニティー分子と荷電キャリア分子のコンジュゲート)を使用するものである。

## 【0146】

例えば、目的物質が血清中に存在する場合には、ノイズ成分(例えばサンプル中に共存する蛋白質等)は目的物質と同じ領域に移動して濃縮される。適切な長さ(例えば50~3000bp)のDNA等の荷電キャリア分子を使用して目的物質とアフィニティー分子/荷電キャリア分子コンジュゲートとを反応させることにより形成された複合体は血清中のノイズ成分と別の領域(例えばノイズ成分の濃度が低いか又は約ゼロである領域)に移動して濃縮される。

20

## 【0147】

本発明において、「不要成分」(例えば「ノイズ成分」)なる用語は通常、目的物質を含有するサンプル又は溶液中に共存する目的物質以外の物質を意味し、従来の電気泳動法により電気泳動を実施した場合には目的物質と同じ領域に移動して濃縮され、目的物質の分離又は検出を妨げる物質である。

30

## 【0148】

不要成分(例えばノイズ成分)としては、例えば蛋白質、核酸、ヘモグロビン、金属、糖、生体色素、脂質、電解質等が上られる。「不要成分」は通常、アフィニティー分子又は分析物(又はその類似体)の標識反応に使用される材料であって、精製段階後も標識材料調製物中に残存している材料も意味する。更に、通常、分析物と反応せずに未結合形態として残存している標識アフィニティー分子又はアフィニティー分子と反応せずに反応混合物中に未結合形態として残存している標識分析物も意味する。本発明の方法は例えば次のように実施することができる。即ち、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリア分子とのコンジュゲートに接触させて分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリア分子とのコンジュゲートの複合体を形成させ、得られた複合体をノイズ成分濃度が低いか又はゼロである領域(例えばノイズ成分が少ない領域)に移動させ、約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮(例えばスタッキング)チャンネルを使用することにより濃縮する。その後、複合体を移動度シフトアッセイに適用することにより、複合体を高感度で検出することによって分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定することができる。

40

## 【0149】

## A. コンジュゲート

本発明のコンジュゲートにおける適切な荷電キャリア分子を選択することにより、目的物質の移動特性(例えば移動度)を制御することが可能となる。コンジュゲートは上述

50

のように検出マーカーで標識されていてもよい。検出マーカー、その好適例、標識方法等については上述した通りである。上記方法では、分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体を濃縮するために、マイクロフルイディックデバイスの濃縮（例えばスタッキング）チャンネルが使用される。上記に例示した濃縮法によりマイクロフルイディックチャンネルでこのような分子とその複合体を濃縮するためには、濃縮しようとするこのような分子を適切なpHとイオン強度の適切なバッファーで希釈することが好ましい。例えば、F A S S濃縮法を選択する場合には、このような被濃縮分子を低伝導率バッファーで希釈した後に接触させ、濃縮段階を実施する。例えば、対象分析物を含む血清サンプルと、分析物を特異的に認識するアフィニティー分子と荷電分子のコンジュゲートを、7.5 mM NaClを含む7.5 mM HEPESバッファー（pH 7.5）で10倍に希釈する。 10

#### 【0150】

##### B. サンプルと目的物質

サンプルと目的物質は上述した通りである。特に、本発明の濃縮法は従来方法を使用するとノイズ成分と同じ領域に移動して濃縮される分析物や、アフィニティー分子及び/又はそのコンジュゲートと共に複合体を形成し、ノイズ成分と同じ領域に移動して濃縮される分析物に有用である。このような分析物とその複合体を上記に例示したような濃縮法によってマイクロフルイディックチャンネルで効率的に濃縮するためには、このような被濃縮分析物を適切なpHとイオン強度の適切なバッファーで希釈することが好ましい。例えば、F A S S濃縮法を選択する場合には、被濃縮分析物を低伝導率バッファーで希釈した後に接触させ、濃縮段階を実施する。例えば、対象分析物を含む血清を、7.5 mM NaClを含む7.5 mM HEPESバッファー（pH 7.5）で10倍に希釈する。 20

#### 【0151】

##### C. サンプルとコンジュゲートとの接触

分析物を含むサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートに接触させ、分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの複合体を形成させるために、接触段階を実施する。このような複合体の形成方法については制限がない。例えば、分析物を含むサンプルと、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートを例えば水又はTris-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファーに夫々溶解、分散又は懸濁して液体材料を得、これらの液体材料を相互に混合接触させればよい。あるいは、サンプルと、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートを同時に溶解、分散又は懸濁してもよい。分析物を含むサンプルが液体である場合には、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートを直接サンプルと混合することができる。上記のように分析物を含むサンプルが液体である場合には、例えば水又はバッファーに溶解、分散又は懸濁しなくてもよい。上記方法では、バッファーの濃度は本発明の分野で通常使用される範囲から選択される。バッファーのpHも本発明の分野で通常使用される範囲から選択される。例えば、サンプルと、アフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートをF A S S法により濃縮する場合には、接触段階は低伝導率のバッファー中で実施することが好ましい。更に、F A S S法により濃縮法を実施する場合には、例えば低濃度のHepes、Taps及びTrisバッファー等の低伝導率のバッファーを低塩濃度で使用することが好ましい。 30 40

#### 【0152】

サンプルをアフィニティー分子と接触させるため、換言するならば、分析物とアフィニティー分子との複合体を形成するためのpHと温度は分析物とアフィニティー分子の性質に依存し、反応条件は濃縮効率にも影響するので、これらの条件を最適化することは通常困難である。しかし、本発明の方法では、複合体の形成を妨げない限り、本発明の分野（例えば公知EIA、RIA、FIA又はハイブリダイゼーションアッセイ）で通常使用さ 50

れている従来方法に従って反応条件を選択することができる。即ち、接触段階は通常はpH約2~10、好ましくはpH5~9で通常は0~90、好ましくは5~40の温度で実施することができる。複合体の形成に必要な反応時間は分析物及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲートの性質によって異なるので、反応はそれらの性質に応じて数秒間から数時間実施することができる。

#### 【0153】

##### D. アフィニティー分子

本発明では、1個以上の追加のアフィニティー分子（例えば荷電キャリアー分子と結合していないアフィニティー分子）を使用することができる。1個以上の追加のアフィニティー分子を使用する目的の一つは目的物質の分離と検出をより容易にすることである。追加のアフィニティー分子の特性、このような分子の例、使用濃度等については上述した通りである。追加のアフィニティー分子は上述のように検出マーカで標識されていてもよい。検出マーカ、その好ましい例、使用する標識方法等については上述した通りである。

10

#### 【0154】

##### E. コンジュゲートとアフィニティー分子の使用

コンジュゲートとアフィニティー分子を使用する場合には、分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子とアフィニティー分子/荷電キャリアー分子コンジュゲートに接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの複合体を形成させ、少なくとも1個の濃縮（例えばスタッキング）チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮（例えばスタッキング）チャンネルを使用することにより、得られた複合体を濃縮する。

20

#### 【0155】

本発明では、2個以上のアフィニティー分子と2個以上のコンジュゲートを使用することができる。この場合には、各アフィニティー分子（各コンジュゲートのアフィニティー分子を含む）は他の全アフィニティー分子と異なる目的物質上の位置で目的物質と結合する。アフィニティー分子とコンジュゲートの両方を使用する場合には、アフィニティー分子とコンジュゲートの少なくとも一方は通常、所定の従来方法により測定（例えば検出）できるものであるか又は検出マーカで標識することが可能なものである。このような性質をもつアフィニティー分子又はコンジュゲートを使用すると、サンプル中の分析物を測定し易くなる。分析物自体が所定の方法により検出可能なもの（例えば酵素等）である場合、又は分析物がアフィニティー分子又はコンジュゲートなしに検出マーカと直接結合できる場合には、アフィニティー分子とコンジュゲートが上記検出可能な性質を有さない場合でもサンプル中の分析物を測定することができる。2個以上のアフィニティー分子又は2個以上のコンジュゲートを使用する場合には全アフィニティー分子又は全コンジュゲートがこのような検出可能な性質を有する必要はない。上記方法において、検出マーカ、アフィニティー分子又はコンジュゲートを検出マーカで標識するために使用する方法等については上述した通りである。

30

#### 【0156】

分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子とコンジュゲートに接触させて分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートの複合体を形成するためには、このような複合体を作製し得る限り、特に制限はない。例えば、分析物を含有するサンプルとアフィニティー分子とコンジュゲートを例えば水又はtris-バッファ、リン酸バッファ、ペロナールバッファ、硼酸バッファ、グッドバッファ、SSCバッファ、TBEバッファ、TAEバッファ等のバッファに夫々溶解、分散又は懸濁して液体材料を得、これらの液体材料を相互に混合接触させればよい。あるいは、サンプルとアフィニティー分子とコンジュゲートを同時に溶解、分散又は懸濁してもよい。分析物を含有するサンプルが液体である場合には、アフィニティー分子及び/又はコンジュゲートをサンプルと直接混合することができる。上記のように分析物を含有するサンプルが液体である場合には、例えば水又はバッファに溶解、分散又は懸濁しなくてもよい。

40

#### 【0157】

50

上記方法では、バッファーの濃度は本発明の分野で通常使用される範囲から選択される。サンプルをアフィニティー分子とコンジュゲートに接触させる段階におけるアフィニティー分子とコンジュゲートの濃度については上述した通りである。反応条件（例えば pH、温度、反応時間等）はサンプルとアフィニティー分子の上記接触条件と同じである。

**【0158】****F. 荷電ポリマー**

本発明の濃縮法では上記荷電ポリマーも使用してもよい。干渉成分と結合することができる荷電ポリマーは例えば成分のコンジュゲート又はコンジュゲートとアフィニティー分子への非特異的結合に起因する疑陽性移動度シフトや、コンジュゲート又はコンジュゲートとアフィニティー分子/成分複合体の不溶性複合体の形成に起因するアッセイの不成功を防止することができるので、本発明の濃縮法では荷電ポリマーを使用することが好ましい。荷電ポリマー、その特性、その例、使用濃度等については上述した通りである。荷電ポリマーを使用する場合には、分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体を荷電ポリマーの存在下で濃縮することができる。

10

**【0159】**

例えば、荷電ポリマーは少なくとも1個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮（例えばスタッキング）チャンネルに存在させるのが好ましい。具体的には、濃縮チャンネルに充填された濃縮（例えばスタッキング）媒体に荷電ポリマーを添加するのが好ましい。濃縮媒体に荷電ポリマーを存在させることにより、サンプル分析間の干渉サンプル成分のキャリーオーバーを低減することができる。代替又は付加態様では、荷電ポリマーは分析物と分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体を含有する溶液（例えば水、ハイブリダイゼーションアッセイ、イムノアッセイ等で使用される *tris*-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファー）中に存在させてもよく、その後、得られた荷電ポリマーと分析物と分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体を含有する溶液を濃縮チャンネルに添加する。更に、荷電ポリマーは、例えば濃縮に使用する溶離液やランニングバッファー（例えば水、ハイブリダイゼーションアッセイ、イムノアッセイ等で使用される *tris*-バッファー、リン酸バッファー、ペロナルバッファー、硼酸バッファー、グッドバッファー、SSCバッファー、TBEバッファー、TAEバッファー等のバッファー）等の、分析物と分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体を含有する溶液をマイクロフルイディックデバイスに添加するために使用される溶液中に存在させてもよい。上記方法において、分析物と分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体とを含有する溶液中に荷電ポリマーを存在させる方法については上述した通りである。

20

30

**【0160】**

更に、本発明の濃縮法では、上述したような理由により、荷電ポリマーは少なくとも濃縮段階で（例えば濃縮媒体中に）存在させることが好ましいが、付加及び/又は代替態様では、分析物を含有するサンプルをコンジュゲート又はコンジュゲートとアフィニティー分子に接触させて複合体を形成させる段階に存在させてもよい。本発明の好適態様では、サンプル中に存在する目的物質の回収率を増すために、荷電ポリマーは分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体の濃縮段階（例えば濃縮媒体中）と、分析物を含有するサンプルとコンジュゲート又はコンジュゲートとアフィニティー分子を接触させて複合体を形成させる段階の両者に存在させる。

40

**【0161】**

上記方法において、サンプルとコンジュゲートの接触段階又はサンプルとコンジュゲートとアフィニティー分子との接触段階に荷電ポリマーを存在させる方法については上述した通りである。使用する荷電ポリマーの濃度等についても上述した通りである。

**【0162】**

50

## G . 濃縮操作

得られた分析物（又は類似体）とコンジュゲートの複合体、分析物（又は類似体）とコンジュゲートとアフィニティー分子との複合体又は分析物（又は類似体）と荷電キャリアー分子とアフィニティー分子との複合体を濃縮する。具体例はキャピラリーで電気泳動移動度の差を利用する電気泳動濃縮法（例えばF A S S , F A S I , I T P , I F 等）、吸着剤を利用する化学吸着濃縮法（例えばS P E 等）等のオンラインサンプル濃縮法ないしサンプルスタッキング操作である。特に、電気泳動濃縮法を使用するのが好ましい（その開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むR . L . C h i e n , E l e c t r o p h o r e s i s , 2 4 , 4 8 6 - 4 9 7 , 2 0 0 3 ）。

## 【 0 1 6 3 】

電気泳動濃縮法のうちでは、所謂動電フォーカシングに基づく方法（例えばI T P , F A S S , F A S I 等）が好ましい。このような方法は例えば以下の原理に基づく。濃縮チャンネル内の移動用バッファゾーンにおける被濃縮目的物質の電気泳動移動度が濃縮チャンネルに添加される前の目的物質を含有する溶液ゾーンにおける電気泳動移動度よりも遅くなるように適切なバッファを選択及び使用することにより、目的物質が目的物質を含有する溶液ゾーンと濃縮チャンネル内の移動用バッファゾーンの境界まで移動すると、目的物質の移動速度は境界で低下し、目的物質は濃縮される（例えばその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込むR . L . C h i e n , E l e c t r o p h o r e s i s , 2 4 , 4 8 6 - 4 9 7 , 2 0 0 3 , R . L . C h i e n , D . S . B u r g i , A n a l . C h e m . , 6 4 , 4 8 9 A , 1 9 9 2 , D . S . B u r g i , R . L . C h i e n , A n a l . C h e m . , 6 3 , 2 0 4 2 , 1 9 9 1 , R . L . C h i e n , D . S . B u r g i , J . C h r o m a t o g r . , 5 5 9 , 1 4 1 , 1 9 9 1 ）。

上記方法を使用することにより本発明の濃縮法を実施するためには、濃縮チャンネル内の移動用バッファにおける複合体〔例えば分析物（又は類似体）/コンジュゲート複合体、分析物（又は類似体）/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体又は分析物（又は類似体）/荷電キャリアー分子/アフィニティー分子複合体〕の電気泳動移動度が濃縮段階に添加する複合体を含有する溶液における電気泳動移動度よりも遅くなるような性質を有するバッファを、濃縮チャンネル内の移動用バッファとして使用することにより、得られた分析物（又は類似体）とコンジュゲートの複合体、分析物（又は類似体）とコンジュゲートとアフィニティー分子の複合体、又は分析物（又は類似体）と荷電キャリアー分子とアフィニティー分子の複体の濃縮が実施される。その結果、複合体が複合体を含有する溶液と濃縮チャンネル内の移動用バッファの境界まで移動すると、複合体の移動速度は境界で低下し、複合体は濃縮される。特に、より具体的には、例えば以下の原理に基づくF A S S 、 I T P を使用するのが好ましい。I T P は目的物質よりも電気泳動移動度の速いリーディングイオンと目的物質よりも電気泳動移動度の遅いトレーリングイオンの2種のイオンの間に目的物質を配置することにより目的物質を濃縮するという原理に基づく方法である。F A S S は分離ドメインの伝導率を濃縮ドメインよりも高くし、濃縮ドメイン内の物質が分離ドメインと濃縮ドメインの境界に到達した際に目的物質の電気泳動移動度が低下し、その後、物質が濃縮されるという原理に基づく方法である（例えば米国特許出願第10/206,386号“Microfluidic Methods, Devices and Systems for In Situ Material Concentration”, Weiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C. E. Electrophoresis 2001, 22, 59-65; Britz-McKibbin, P., Bebaullt, G. M., Chen, D. D. Y. Anal Chem. 2000, 72, 1729-1735, Ross, D., Locascio, L. E. Anal Chem. 2002, 71, 5137-5145）。上記濃縮法のうちでは、分析物と結合したコンジュゲート中の荷電キャリアー分子の電荷に基づいて複合体を濃縮する濃縮法を使用することが好ましい。

## 【 0 1 6 4 】

本発明では、上記のような濃縮法で従来使用されている全てのバッファ、充填剤、各

10

20

30

40

50



種試薬（例えば処理溶液）等を利用することができる。これらの材料の濃度は場合により公知濃縮法に従って選択することができる。濃縮条件（例えばpH、温度、印加電圧、時間等）は公知方法に従って適当に選択することができる。

#### 【0165】

マイクロフルイディックデバイスで等速電気泳動法（ITP）により対象分析物を元の分析物サンプルよりも小容量にスタッキング（例えば濃縮）することができる。例えば、サンプルポラスをチャンネル内の2種のバッファースystemの間に導入し、電流を流し、移動度が低下する順に移動する溶質ゾーンの定常状態を作ることができる。定常状態では、ゾーンはリーディング電解液と同じ濃度であり、同じ速度でチャンネルを移動することができる。あるいは、サンプルポラスを電解液付近に添加し、例えばITP電解液間で定常状態平衡に到達することなしに、動的（例えば過渡的）条件下で注入用界面にスタッキングすることができる。スタッキングは例えばマイクロフルイディックデバイスの濃縮（例えばスタッキング）チャンネルで実施することができ、サンプルはトレーリング電解液とリーディング電解液のチャンネル領域間にロードされる。

10

#### 【0166】

図8Aに示すように、分析物サンプル80を真空ウェル82とサンプルウェル83の圧力差によりローディングチャンネルセグメント81にロードすることができる。電場をスタッキング（例えば濃縮）チャンネルセグメント84に印加すると、図8Bに示すように、高移動度（例えば高電荷対質量比）のリーディング電解液85、中間移動度の分析物86、及び低移動度のトレーリング電解液87により電流が流れる。ITPが進行するにつれ、荷電分析物86の濃度がリーディング電解液85の濃度に等しくなる点まで分析物86の容量が低下する定常状態に達する。定常状態では、図8Cに示すように、スタッキングされた分析物溶液はリーディング電解液85及びトレーリング電解液87と同一速度でスタッキングチャンネルセグメント84を移動し、電解液と荷電分析物はスタッキングチャンネルセグメントにおいて単位容量当たり同一量の電流を輸送する。分析物と電解液の電荷密度や過渡的移動速度差等の因子はITP中に分析物と電解液をゾーンに分ける傾向がある。本発明のスタッキングチャンネルセグメントは任意サイズとすることができ、約500 $\mu\text{m}$ ～約0.1 $\mu\text{m}$ 、又は約100 $\mu\text{m}$ ～約1 $\mu\text{m}$ 、又は約10 $\mu\text{m}$ の幅又は深さ等の寸法を有するマイクロスケールチャンネルが挙げられる。

20

#### 【0167】

スタッキングは過渡状態で実施することもできる。例えば、図9Aに示すように、当初は希薄で分散した分析物分子90は例えば図9Bに示すようにリーディング電解液界面91に蓄積させることができる。界面におけるこの分析物濃縮は定常状態の均一な分析物と電解液キャリアの濃縮に達する前に行われる。場合により、分析物は過渡状態、例えばITPの初期電場印加中にトレーリング電解液界面92に蓄積させることができる。過渡ITPの他の態様では、分析物はITP電解液の界面以外のゾーンで濃縮させることもできる。複数の対象分析物が定常状態又は過渡状態で例えば電解液界面の一方又は両方に蓄積される。例えば図10A～10Cに示すように、第1の対象分析物101と第2の対象分析物102を含有するサンプル溶液100をトレーリング電解液103とリーディング電解液104の間に導入することができる。第1の分析物の移動度が第2の分析物よりも遅く且つトレーリング電解液の移動度よりも速い場合には、第1の分析物は電場の存在下にトレーリング電解液との界面に蓄積される。他方、図10Bに示すように過渡状態では、第1の分析物よりも多少移動度の速い第2の分析物は更に移動度の速いリーディング電解液との界面に沿ってサンプルポラスの他端に蓄積される。こうして、当業者に自明の通り、第1の分析物と第2の分析物を1個以上の分離チャンネルセグメントに別々に逐次又は同時に添加することができる。図10Cに示すように、ITP中に定常状態に一旦達すると、第1及び第2の荷電分析物は例えば分離チャンネルセグメントで分解するために同時に添加できるように狭い隣接バンドに圧縮される。

30

40

#### 【0168】

本発明の方法では、トレーリング電解液とリーディング電解液の移動度は非対象サン

50

ル成分を分析物から分離しながら対象分析物の選択的前濃縮を実施できるように調節することができる。例えば、図11Aに示すように、対象分析物111と低移動度の非対象サンプル成分112と高移動度の非対象サンプル成分113を含有するサンプル溶液110をトレーリング電解液114とリーディング電解液115の間にロードすることができる。電場をチャンネルに印加すると、図11Bに示すように、低移動度の非対象サンプル成分112はトレーリング電解液よりも遅れ、高移動度の非対象サンプル成分113はリーディング電解液を追い越す。定常状態までITPを続けると、例えば図11Cに示すように、非対象サンプル成分を分析物から更に分離することができる。非対象サンプル成分を対象分析物から除去すると、分離チャンネルセグメントで分離するための材料注入を改善することができる。サンプルをITPにより前処理して非対象サンプル成分を除去した後、分離チャンネルセグメントに添加した対象分析物を分析すると、例えばバックグラウンドノイズが低下し、注入容量の低減により分解能が増加し、ベースラインの改善とオーバーラップするピークの減少により定量確度が増す等の効果が得られる。

10

20

30

40

50

#### 【0169】

非対象サンプル成分を除去しながら対象分析物の高度に特異的な保持とスタッキング（例えば濃縮）を実現するように電解液移動度を調節することにより、当分野で公知の方法によりトレーリング電解液とリーディング電解液を調整することができる。1態様では、電解質のpHは、分析対象物のpKをはさむ範囲に入るように選択され、これによりその範囲以外のpKをもつサンプル中の非対象成分は、ITPによって除外される。対象分析物のpKは例えば経験によるか又は分析物の既知分子構造に基づいて求めることができる。他の態様では、例えば分析物よりも遅い移動度と速い移動度をもつことがわかっているトレーリング電解液とリーディング電解液の組成の範囲に対象分析物が厳密に含まれるように選択することができる。分析物の範囲を設定するには、例えば塩化物、TAPS、MOPS、及びHEPES等の多数のイオンとバッファーを電解液で使うことができる。場合により、サンプル溶液、トレーリング電解液、及び/又はリーディング電解液の粘度又はサイズ排除特性を調節することにより、電解液及び/又は分析物の移動度を調節することができる。ITP溶液の移動度を調節する別の手段としては、溶液の濃度、イオン強度、又は伝導率を調節することにより、特に過渡的ITP移動中に、分析物溶液及び/又は電解液の移動度を調節することができる。分析物、電解液、又はITP溶液の移動度を調節するための更に他の手段として、溶液の温度を選択することができる。

#### 【0170】

本発明を実施してサンプル中の対象分析物を検出する目的で濃縮するためには当分野で公知の種々の免疫化学アッセイ技術を使用することができ、例えば抗体サンドイッチアッセイや酵素イムノアッセイ（イムノアッセイの一般論については例えばBoltonら、Handbook of Experimental Immunology, Weir, D.M., Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1986, vol. 1, Chapter 26参照）、及び当業者に公知の他の同様のアッセイフォーマットが挙げられる。例えば、図3A~3Kに示す上記アッセイフォーマットでは、本発明を使用して分析物又は分析物の類似体とコンジュゲートを含む複合体を濃縮することができる。

#### 【0171】

上記図3A~3Fに示すサンドイッチアッセイフォーマットの具体例を以下に挙げる。（a）サンプル中の分析物の濃縮法が開示され、（i）アフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカーで標識された、1個以上のコンジュゲートに分析物を含有するサンプルを接触させ、分析物と検出マーカーで標識されたコンジュゲートとを含む複合体を形成させる段階と；（ii）マイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルで複合体を濃縮する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有

し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

【0172】

(b) サンプル中の分析物の濃縮法が開示され、(i) アフィニティー分子の少なくとも1個又はコンジュゲートの少なくとも1個が検出マーカーで標識されたものであり、1個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートを含む複合体を形成させる段階と；(ii) マイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルで複合体を濃縮する段階を含み；アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子が分析物と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なる分析物上の位置で分析物と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

10

【0173】

上記図3G～3Kに示す競合アッセイフォーマットの具体例を以下に挙げる。(a) サンプル中の分析物の濃縮法が開示され、(i) 検出マーカーで標識された分析物(又は類似体)及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させ、分析物とコンジュゲートとの第1の複合体及び標識分析物(又は標識類似体)とコンジュゲートとの第2の複合体を形成させる段階と；(ii) 第2の複合体を濃縮する段階を含み；コンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のコンジュゲートを使用する場合には、コンジュゲートの各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質を有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の移動特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

20

30

【0174】

(b) サンプル中の分析物の濃縮法が開示され、(i) 検出マーカーで標識された分析物(又は類似体)、1個以上のアフィニティー分子及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに分析物を含むサンプルを接触させ、分析物とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第1の複合体及び標識分析物(又は標識類似体)とアフィニティー分子とコンジュゲートとの第2の複合体を形成させる段階と；(ii) 第2の複合体を濃縮する段階を含み；アフィニティー分子及びコンジュゲートのアフィニティー分子がサンプル中の分析物及び標識分析物又はサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び標識分析物上の位置でサンプル中の分析物及び標識分析物と結合することが可能な性質をも有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の各分析物上の位置及び標識類似体上の位置でサンプル中の分析物及び標識類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して標識分析物又は標識類似体と結合して標識分析物又は標識類似体とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより標識分析物又は標識類似体の移動特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

40

【0175】

50

(c) サンプル中の分析物の濃縮法が開示され、(i) 荷電キャリアー分子と結合した分析物(又は荷電キャリアー分子と結合した類似体)及び検出マーカで標識された1個以上のアフィニティー分子に分析物を含有するサンプルを接触させ、荷電キャリアー分子と結合した分析物(又は荷電キャリアー分子と結合した類似体)と標識アフィニティー分子との第1の複合体及び分析物と標識アフィニティー分子との第2の複合体を形成させる段階と; (ii) 第1の複合体を濃縮する段階を含み; アフィニティー分子がサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物又はサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有するものであって、2個以上のアフィニティー分子を使用する場合には、各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した分析物上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した分析物と結合することが可能な性質をも有するか、又は各アフィニティー分子が他の全アフィニティー分子と異なるサンプル中の分析物上の位置及び荷電キャリアー分子と結合した類似体上の位置でサンプル中の分析物及び荷電キャリアー分子と結合した類似体と結合することが可能な性質を有し、荷電キャリアー分子が分析物又は類似体と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより第1の複合体の移動特性に変化を生じさせることが可能な性質を有するものである。

#### 【0176】

##### H. マイクロフルイディックデバイス

本発明では、通常、上記濃縮法に基づくマイクロフルイディックデバイスを含むマイクロフルイディックシステムを使用することにより分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/コンジュゲート/アフィニティー分子複合体の濃縮を実施することができる。本発明の濃縮法で使用するマイクロフルイディックデバイスは濃縮媒体を充填することができる少なくとも1個以上の濃縮(例えばITPスタッキング)チャンネルを有するものである。本発明の濃縮法では濃縮媒体を充填することができる少なくとも1個以上の濃縮チャンネルと濃縮チャンネルに流体的に接続されたチャンネルを有するマイクロフルイディックデバイスを使用することが好ましい。濃縮チャンネルと濃縮チャンネルに流体的に接続されたチャンネルは上記分離チャンネルと同じ特性をもつものである。本発明の濃縮法の実施後に引き続き目的物質の分離と測定を実施する場合には、上記のような1個以上の分離チャンネル、サンプル導入チャンネル、サンプル混合チャンネル、検出器等を更に含むマイクロフルイディックデバイスを使用するのが好ましい。

#### 【0177】

##### I. 濃縮媒体

濃縮媒体は上記分離媒体と同一とすることができる。濃縮媒体は使用される濃縮法に応じて適宜選択される。使用される濃縮媒体の濃度は使用される濃縮法に応じて上記範囲から適宜選択される。使用される濃縮法によってはこのような濃縮媒体を使用する必要はない。

#### 【0178】

##### J. 分離と検出

得られたサンプル中の濃縮分析物(例えば分析物又は分析物の類似体とコンジュゲートを含む複合体)を上記移動度シフトアッセイに適用する。本発明の濃縮法により濃縮された分析物を移動度シフトアッセイに適用することにより、分析物を高感度で測定(例えば同定又は検出)することができる。本発明の濃縮法により濃縮された分析物は上記任意の移動度シフトアッセイで使用することができる。即ち、得られた目的物質及び荷電キャリアー分子とアフィニティー物質とのコンジュゲートを含む濃縮複合体(例えば分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体)を複合体と遊離のアフィニティー物質の移動速度の差に基づいて複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質(例えばアフィニティー分子及び/又はコンジュゲート)から分離する。その後、上記分離法により分離された分析物/アフィニティー物質複合体(又は分析物/コンジュゲート複合体又は分析物/アフィニティー分子/コンジュゲート複合体)又

は複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー物質（例えば遊離のアフィニティー分子及び／又は遊離のコンジュゲート）を該当分子の検出可能な性質の特性に対応する方法（例えば結合した検出マーカ）により測定又は検出することができる。こうして、サンプル中の分析物の量を測定するか又はサンプル中の分析物の存在を同定することができる。即ち、上記分離法に従って、分析物／コンジュゲート複合体を複合体の形成に関与しない遊離のコンジュゲートから分離するか、又は分析物／アフィニティー分子／コンジュゲート複合体を複合体の形成に関与しない遊離のアフィニティー分子及び／又はコンジュゲートから分離する。得られた複合体、又は遊離のアフィニティー分子及び／又は遊離のコンジュゲートをこれらの特性に対応する方法（例えば検出マーカ）により測定又は検出することができる。分離操作、分離媒体、検出等については上述した通りである。

10

## 【0179】

本発明の濃縮法により濃縮された分析物を本発明の上記分離及び検出法に適用すれば、目的物質の高感度で高確度の測定を達成することができる。本発明の濃縮法により濃縮された分析物を移動度シフトアッセイに適用する場合には、適用する移動度シフトアッセイの原理は分析物を濃縮するための濃縮法の原理と同一でもよいし、分析物を濃縮するための濃縮法の原理と異なるものでもよい。目的物質を高確度で分離及び測定するためには、移動度シフトアッセイの原理は分析物を濃縮するための濃縮法の原理と異なることが好ましい。例えば、分析物を濃縮するためにITPを使用する場合には、分離及び測定のための移動度シフトアッセイはITP以外の方法（例えばFASS、FA SI、IF等）から適宜選択される。

20

## 【0180】

上記方法の非限定的な具体例を以下に挙げる。サンプル中の対象分析物の検出又は同定方法が開示され、(i)分析物を含有するサンプルをアフィニティー分子と荷電キャリアー分子との1個以上のコンジュゲートに接触させて分析物とコンジュゲートとの複合体を形成させる段階と；(ii)約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の濃縮チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャンネルを使用することにより複合体を濃縮する段階と；(iii)約0.1~500ミクロンの少なくとも1個のマイクロスケール寸法を有する少なくとも1個の分離チャンネルを含むマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルを使用することにより必要に応じて荷電ポリマーの存在下に複合体と未結合のコンジュゲートを分離する段階と；(iv)複合体を検出して分析物の存在を同定するか又はサンプル中の分析物の量を測定する段階を含み；荷電ポリマーが検出干渉を低減するものであり；荷電キャリアー分子がアフィニティー分子を介して分析物と結合して分析物とアフィニティー分子と荷電キャリアー分子の複合体を形成することにより分析物の移動特性に変化を生じさせるものである。

30

## 【0181】

以下、非限定的な実施例により移動度シフトアッセイにおける干渉を低減するための本発明の種々の使用と方法を例証する。

## 【実施例1】

## 【0182】

以下の非限定的な実施例は - フェトプロテインイムノアッセイにおける血清干渉をブロックするための荷電ポリマーとしてのヘパリン硫酸の使用を例証する。

40

試薬：

ゲル：2.5% pDMA / 3% グリセロール / 0.05% Tween 20 / 0.1% BSA / 150 mM HEPES / NaCl / 2.5 mg / ml LCA (pH: 7.5)。

血清サンプル用バッファー（以下、サンプルバッファーと略す）：7.5 mM HEPES / 0.025% Tween - 20 / 0.1% BSA + 20 nM 抗AFPモノクローナル抗体 WA - 2 IgG (pH: 7.5)。モノクローナル抗体は社内で作製した (H. Kato hら, Anal. Chem. (1998) 70, 2110 - 2114)。

抗体用バッファー（以下、抗体バッファーと略す）：7.5 mM HEPES / NaCl / 0.025% Tween - 20 / 0.01% BSA (pH: 7.5)。

50

標識抗AFP抗体/DNAコンジュゲート：3 nM 4 Alexa Fluor 647抗AFPモノクローナル抗体WA-1-140 bp DNAコンジュゲート；Alexa Fluor 647色素はMolecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon)から購入し、DNA荷電キャリアー分子はPCR反応により作製した。抗AFPモノクローナル抗体WA-1はWA-2と異なるAFPのエピトープを認識する。コンジュゲートは先にその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込んだ日本特許出願第W002/082083号に記載の方法に従って作製した。モノクローナル抗体は社内で作製した(H. Kato et al., Anal. Chem. (1998) 70, 2110-2114)。140 bp DNAは次のように作製した。フォワードプライマーとして合成配列5' - GGT TAG CA A C T T A C T A C C G G A T T T T G - 3'、リバープライマーとして合成配列5' - C C T A G C A A A C T C G G A A G A T T T T T T C A G A - 3'及び鋳型としてDNA (New England Bio Labs, Inc., Beverly, MA製品)を使用することによりPCR反応を実施した。アニール温度は60とした。増幅後、増幅DNAフラグメントを精製し、Agilent Bioanalyzer 2100 DNAキット(Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)を使用して140 bp長であることを確認した。

10

荷電ポリマー：ヘパリン硫酸(Sigma-Aldrich)。

#### 【0183】

移動度シフトアッセイ：

20

ヘパリン硫酸を添加しないサンプルバッファー(図4)と0.05%ヘパリン硫酸を添加したサンプルバッファー(夫々図5A~B及び6A~B)で血清サンプルを10倍に希釈し、(図2に示したものと同様のマイクロフルイディックチップ20を使用して)オンチップで標識抗AFP抗体-DNAコンジュゲートと混合した。(例えば図2のチップ20のインキュベーションチャンネル24で)オンチップで1分間インキュベーション中にコンジュゲート複合体が形成された。(例えば図2のマイクロフルイディックチップ20のインキュベーションチャンネル24で)インキュベーション後に、得られた混合物を電気泳動によりスタッキングし、夫々ヘパリン硫酸を添加しない(図4)か、0.1%ヘパリン硫酸(図5)、及び1%ヘパリン硫酸(図6)を添加したpDMAポリマーを充填した分離チャンネル(例えば図2のチップ20の分離チャンネル25)に注入した。図2のチップ20の分離チャンネル25に電圧を印加し、移動度の異なる遊離のコンジュゲートと複合体とを分離した。サンプルバッファーとゲル内のヘパリン硫酸は血清成分がコンジュゲートのDNA部分に非特異的に結合するのを防止すると共に、分離中のゲル内の血清干渉をブロックするように作用した。例えば、図4はサンプル又は分離媒体(例えばゲル)に荷電ポリマー(例えばヘパリン硫酸)を添加しない場合の分離媒体中のコンジュゲートピーク40(例えばDNA-抗体-Alexa色素コンジュゲート)(例えば無血清)及び40'(例えば10%血清添加)間とコンジュゲート/AFP複合体ピーク42(無血清)及び42'(10%血清添加)間の-フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示す。

30

#### 【0184】

40

血清をサンプルに添加すると、図4に参照番号40'及び42'で示すように干渉成分が複合体ピーク40及び42の保持時間、高さ、及び面積を変化させる。荷電ポリマー(例えばヘパリン硫酸)をアッセイに添加すると、図5A~B及び6A~Bに示すように干渉変化を低減することができる。図5A~Bはサンプルに0.05%ヘパリン硫酸を添加した場合と分離媒体に0.1%ヘパリン硫酸を添加した場合の-フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示し、ヘパリン硫酸がDNAポリマーと非特異的に結合するサンプル成分と結合することにより検出干渉を低減する効果をもつことが分かる(例えば血清サンプルからのAFP回収率約60%)。図6A~Bはサンプルに0.05%ヘパリン硫酸を添加した場合と分離媒体に1%ヘパリン硫酸を添加した場合の-フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示し、夫々ほぼオーバーラップするコンジュゲ

50

ートピーク40及び40'とAFP/コンジュゲート複合体ピーク42及び42'から明らかなように、血清サンプルからのAFP回収率は約100%である。このように、分離媒体とサンプルバッファーに荷電ポリマーとしてヘパリン硫酸を添加すると、キャリア分子と非特異的に結合するサンプル成分と結合することにより分析物検出への干渉の低減に顕著な効果がある。

#### 【実施例2】

##### 【0185】

以下の非限定的な実施例は血清を添加したAFPアッセイにおけるITPの使用を例証し、5%血清を添加し、0.01% Poly dI-dCを添加した場合と添加しない場合の結果を示す電気泳動図の1例である。本実施例ではヘパリン硫酸の代わりにpoly (dI-dC)を荷電ポリマーとして使用し、血清干渉を排除した。poly (dI-dC)の濃度は約0.01% (w/v)とした。

リーディングバッファー：15mM Tris / 50mM NaCl / 0.9% pDMA / 0.05% Tween-20 / 0.01% BSA。

トレーリングバッファー：15mM Tris / 25mM HEPES / 0.9% pDMA / 0.05% Tween-20 / 0.01% BSA。

リーディングバッファー中のサンプルに10%血清と100nM 抗AFPモノクローナル抗体WA-2 IgG、100µg/ml poly (dI-dC)を添加した。モノクローナル抗体は社内で作製した(H. Kato hira, Anal. Chem. (1998) 70, 2110-2114)。

サンプルをA b溶液と1:1で混合することにより結合反応をオフチップで実施した。

標識抗AFP抗体/DNAコンジュゲート：500pM 2 Alexa Fluor 647 抗AFPモノクローナル抗体WA-1-140bp DNAコンジュゲート；Alexa Fluor 647色素はMolecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon)から購入し、DNA荷電キャリア分子はPCR反応により作製した。抗AFPモノクローナル抗体WA-1はWA-2と異なるAFPのエピトープを認識する。コンジュゲートは先にその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込んだ日本特許出願第WO02/082083号に記載の方法に従って作製した。モノクローナル抗体は社内で作製した(H. Kato hira, Anal. Chem. (1998) 70, 2110-2114)。140bp DNAは次のように作製した。フォワードプライマーとして合成配列5'-GGTTAGCAACTTACTACCGGATTTTG-3'、リバースプライマーとして合成配列5'-CCTAGCAAACCTCGGAAGATTTTTCAGA-3'及び鋳型としてDNA (New England Bio Labs, Inc., Beverly, MA製品)を使用することによりPCR反応を実施した。アニール温度は60とした。増幅後、増幅DNAフラグメントを精製し、Agilent Bioanalyzer 2100 DNAキット(Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)を使用して140bp長であることを確認した。

荷電ポリマー：Poly (dI-dC) (Sigma-Aldrich)。

##### 【0186】

図7A~Bは上記実施例1で使用したのと同様のマイクロフルイディックデバイスの分離チャンネルにおける分離媒体中で実施した、コンジュゲートピーク50(例えばDNA-抗体-Alexa色素コンジュゲート)(5%血清を添加し、Poly dI-dC不添加)及び50'(5%血清と約0.01% Poly dI-dCを添加)間とコンジュゲート/AFP複合体ピーク52(5%血清を添加し、Poly dI-dC不添加)及び52'(5%血清と約0.01% Poly dI-dCを添加)間のフェットプロテインアッセイの時間(X軸)に対する相対蛍光強度(Y軸)の移動度シフトチャートを示す。図7A~Bから明らかなように、荷電ポリマー(例えばPoly dI-dC)をアッセイに添加すると、DNAポリマーと非特異的に結合するサンプル成分と結合することにより検出干渉を低減することができる(例えば血清サンプルからのAFP回収率約60%

)。ITP法を使用すると、サンプル濃縮ないしスタッキング技術を利用しない従来のキャピラリー電気泳動アッセイに比較してアッセイの感度を（例えば図面に相対ピーク高により示すように）約100倍以上増加することができる。

### 【実施例3】

#### 【0187】

以下の非限定的な実施例はCA19-9サンプルを濃縮するための荷電キャリアー分子としてのDNAの使用を例証する。

リーディングバッファー：15mM Tris / 50mM NaCl / 0.2% pDMA / 0.05% Tween-20 / 0.01% BSA。

トレーリングバッファー：15mM Tris / 25mM HEPES / 0.2% pDMA / 0.05% Tween-20 / 0.01% BSA 10

標識抗CA19-9抗体：抗体とAlexa647スクシンイミド (Molecular probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) を0.2M重炭酸ナトリウムバッファー (pH 8.3) 中で2時間混合することにより抗CA19-9モノクローナル抗体 (IgG) (Biodesign international) をAlexaで標識した後、反応混合物をゲル濾過及びDEAEイオン交換クロマトグラフィーに添加することにより未結合のAlexa色素を混合物から除去した。

抗CA19-9抗体/DNAコンジュゲート：抗CA19-9モノクローナル抗体 (IgG) (Biodesign international) と250bp DNAのコンジュゲートは日本特許出願第WO02/082083号に記載の方法に従って作製した 20。250bp DNAは次のように作製した。5'末端にNH<sub>2</sub>基をもつフォワードプライマーとして合成配列5'-ATCTATGACTGTACGCCACTGTCCCTAG-3'、リバースプライマーとして合成配列5'-CCTAGCAAACCTCGGAAGATTTTTTCAGA-3'及び鋳型としてDNA (New England Bio Labs, Inc., Beverly, MA製品) を使用することによりPCR反応を実施した。アニール温度は60とした。増幅後、増幅DNAフラグメントを精製し、Agilent Bioanalyzer 2100 DNAキット (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) を使用して250bp長であることを確認した。

サンプル：下記方法により得られた標識抗CA19-9抗体 (CA19-9不添加)、 30  
標識抗CA19-9抗体とCA19-9の複合体を含む混合物、及び抗CA19-9抗体/DNAコンジュゲートとCA19-9と標識抗CA19-9抗体の複合体を含む混合物をサンプルとして使用した。

標識抗CA19-9抗体 (CA19-9不添加)：2nM精製Alexa標識抗CA19-9。

標識抗CA19-9抗体とCA19-9の複合体を含む混合物：2nM精製Alexa標識抗CA19-9を1000U/mL CA19-9 (Biodesign international) と混合し、混合物を室温に30分間維持して抗原-抗体複合体を作製した。抗CA19-9抗体/DNAコンジュゲートとCA19-9と標識抗CA19-9抗体の複合体を含む混合物：作製した抗CA19-9抗体/DNAコンジュゲートを種 40  
々の濃度 (0、10又は100U/mL) のCA19-9及び2nM Alexa標識抗CA19-9抗体と混合し、混合物を室温で30分間インキュベートした。

#### 【0188】

濃縮操作：次に、導入チャネルの下流に配置し、リーディングバッファーを充填した濃縮チャネルと、濃縮チャネルの上流に配置し、トレーリングバッファーを充填したトレーリングバッファーチャネルとに流体的に接続された導入チャネルにサンプルを添加した。導入チャネルにサンプルを充填した後、電場を印加し、ITP原理に従って濃縮を実施した。図12A~Bはマイクロフルイディックデバイスの濃縮チャネルで実施したCA19-9濃縮の時間 (X軸) に対する相対蛍光強度 (Y軸) の移動度シフトチャートを示す。

#### 【0189】



図12Aは標識抗CA19-9抗体(CA19-9不添加)(標識抗体ピーク121:例えば標識抗CA19-9抗体)及び標識抗CA19-9抗体とCA19-9の混合物(標識抗体/抗原複合体ピーク121':例えば標識抗CA19-9抗体とCA19-9抗原の複合体)の実験結果を示す。

【0190】

図12Bは標識抗CA19-9抗体とDNA-標識抗CA19-9抗体とCA19-9の混合物(コンジュゲート/抗原/標識抗体ピーク122:例えば0U/mL CA19-9を使用することにより得られた抗CA19-9抗体とDNA/CA19-9抗原/標識抗CA19-9抗体とのコンジュゲート;コンジュゲート/抗原/標識抗体ピーク122':例えば10U/mL CA19-9を使用することにより得られた抗CA19-9抗体とDNA/CA19-9抗原/標識抗CA19-9抗体とのコンジュゲート;及びコンジュゲート/抗原/標識抗体ピーク122":例えば100U/mL CA19-9を使用することにより得られた抗CA19-9抗体とDNA/CA19-9抗原/標識抗CA19-9抗体とのコンジュゲート)の結果を示す。

10

【0191】

図12Aに示すように、目的物質(例えばCA19-9)とアフィニティー分子(例えば標識抗CA19-9抗体)の複合体は遊離の(未結合の)アフィニティー分子よりも多少迅速に移動したが、濃縮されなかった。他方、図12Bに示すように、目的物質(例えばCA19-9抗原)、アフィニティー分子(例えばAlexa標識抗CA19-9抗体)、及びアフィニティー分子と荷電キャリアー分子とのコンジュゲート(例えば抗CA19-9抗体/DNAコンジュゲート)の複合体は非常に有効に濃縮され、その結果、複合体のピークは非常にシャープになった。更に、ピークはCA19-9抗原濃度と良好に相関した。即ち、濃縮段階で荷電キャリアー分子(例えばDNA)を使用すると、目的物質を非常に高濃度に濃縮することができる。

20

【0192】

当然のことながら、本明細書に記載する実施例と態様は例証のみを目的とし、これらを参考に種々の変形又は変更が当業者に示唆され、これらの変形又は変更も本明細書の精神及び範囲内であり、特許請求の範囲に含まれる。本明細書に引用する全刊行物、特許及び特許出願はその開示内全体を全目的で参考資料として本明細書に組込む。

【図面の簡単な説明】

30

【0193】

【図1】図1Aは干渉サンプル成分の不在下におけるアッセイの移動度シフトチャートを示し;図1Bはサンプル干渉成分を添加したアッセイを示し;図1Cは荷電ポリマーの添加による干渉の低減を示す。

【図2】実施例で使用した移動度シフトアッセイを実施するためのマイクロフルイディックデバイスの模式図である。

【図3A】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図3B】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

40

【図3C】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図3D】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図3E】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図3F】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図3G】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

50

【図 3 H】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図 3 I】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図 3 J】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図 3 K】本発明の方法を使用してサンプル中の対象分析物を検出するために使用することができる種々のイムノアッセイフォーマットの模式図である。

【図 4】実施例 1 でサンプル又は分離媒体（例えばゲル）に荷電ポリマー（例えばヘパリン硫酸）を添加せずに得られた  $\alpha$ -フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示す。 10

【図 5】図 5 A はサンプルに 0.05% ヘパリンを添加し、分離媒体に 0.1% ヘパリンを添加した  $\alpha$ -フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示し；図 5 B は実施例 1 で得られた図 5 A のチャートの一部の拡大図である。

【図 6】図 6 A はサンプルに 0.05% ヘパリンを添加し、分離媒体に 1% ヘパリンを添加した  $\alpha$ -フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示し；図 6 B は実施例 1 で得られた図 6 A のチャートの一部の拡大図である。

【図 7】図 7 A は 5% 血清を添加し、0.01% Poly d I - d C を添加した場合と添加しない場合の  $\alpha$ -フェトプロテインアッセイの移動度シフトチャートを示し；図 7 B は実施例 2 で得られた図 7 A のチャートの一部の拡大図である。 20

【図 8】等速電気泳動マイクロフルイディックシステムの模式図である。

【図 9】リーディング電解液との界面で分析物を濃縮する過渡的 I T P の模式図である。

【図 10】対象分析物の過渡的 I T P 分離と分析物の定常状態 I T P 並列の模式図である。

【図 11】I T P 中のサンプル成分の選択的除去の模式図である。

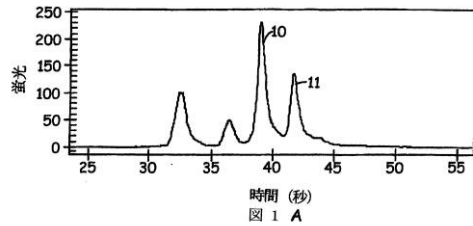
【図 12】図 12 A は標識抗 C A 19 - 9 抗体のサンプル（C A 19 - 9 不添加）又は標識抗 C A 19 - 9 抗体と C A 19 - 9 の混合物のサンプルを使用して実施例 3 で得られた C A 19 - 9 濃縮の移動度シフトチャートを示し；図 12 B は標識抗 C A 19 - 9 抗体と D N A - 標識抗 C A 19 - 9 抗体と各種濃度（0、10又は100 U / m L）の C A 19 - 9 の混合物を使用して実施例 3 で得られた C A 19 - 9 濃縮の移動度シフトチャートを示す。 30

【符号の説明】

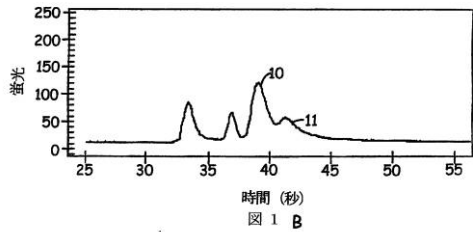
【0194】

- 20 マイクロフルイディックデバイス
- 21 サンプルウェル、試薬ウェル
- 22 シッパーキャピラリーチューブ
- 24 インキュベーションチャンネル
- 25 分離チャンネル
- 26 検出器

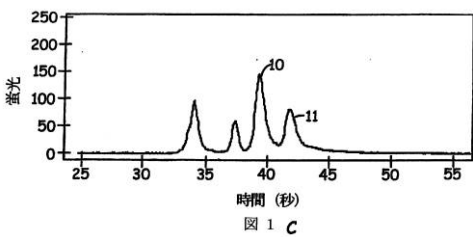
【 図 1 】



時間 (秒)  
図 1 A

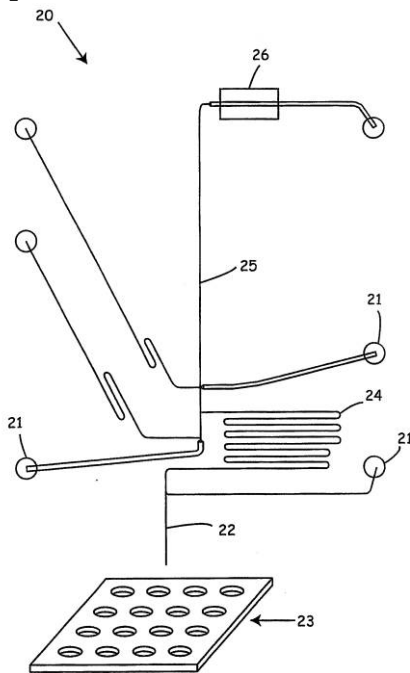


時間 (秒)  
図 1 B

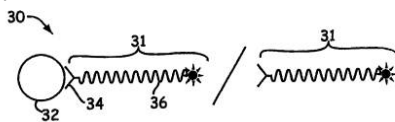


時間 (秒)  
図 1 C

【 図 2 】



【 図 3 A 】



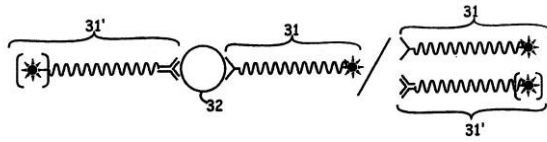
【 図 3 B 】



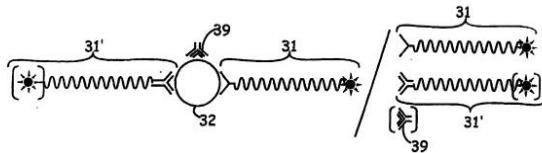
【 図 3 C 】



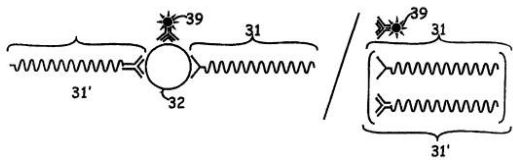
【 図 3 D 】



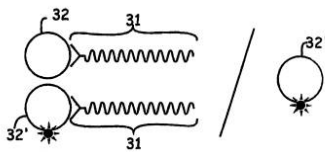
【 図 3 E 】



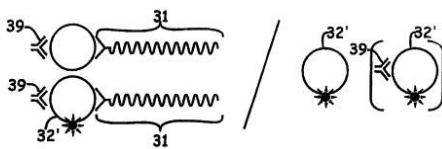
【 図 3 F 】



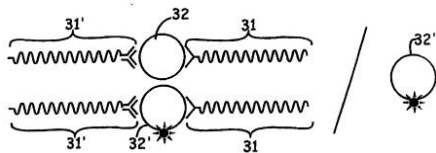
【 図 3 G 】



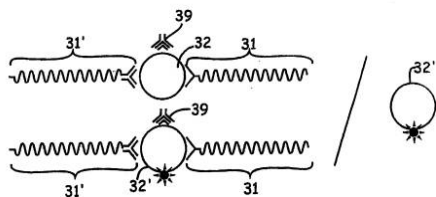
【 図 3 H 】



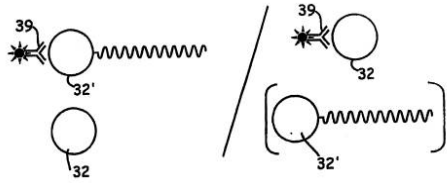
【 図 3 I 】



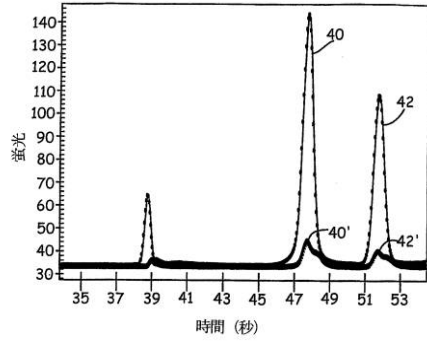
【 図 3 J 】



【 図 3 K 】



【 図 4 】



【 図 5 】

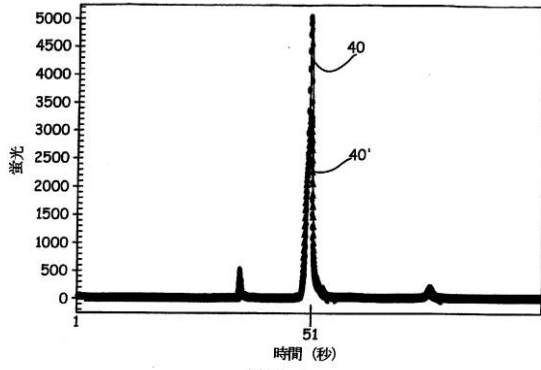


図 5 A

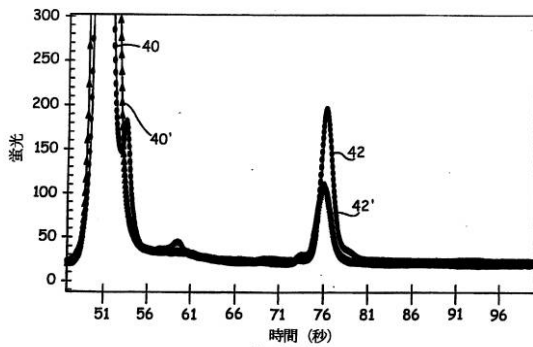


図 5 B

【 図 6 】

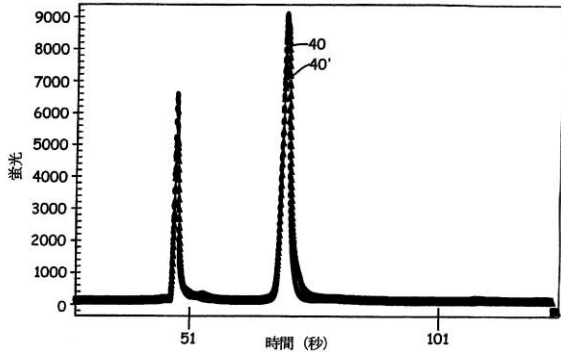


図 6 A

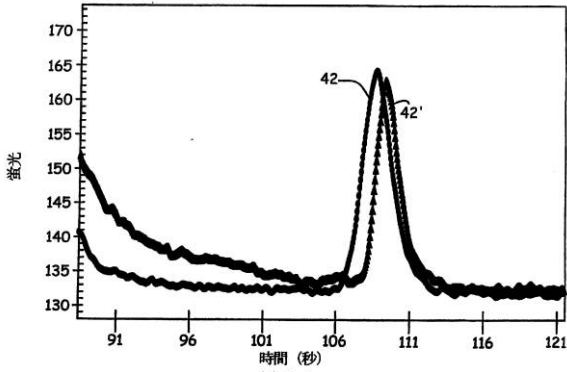


図 6 B

【 図 7 】

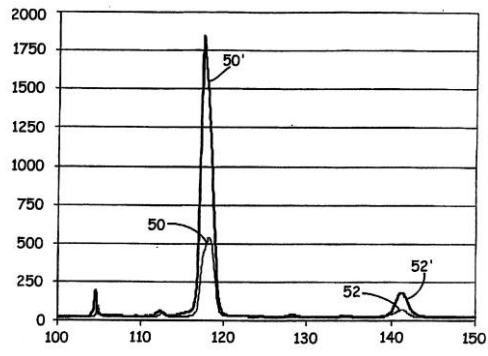


図 7 A

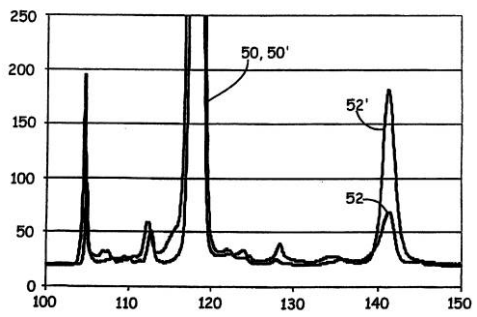
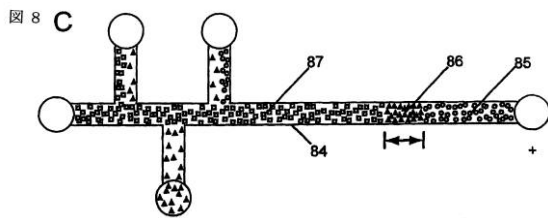
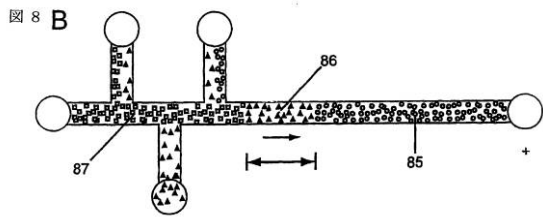
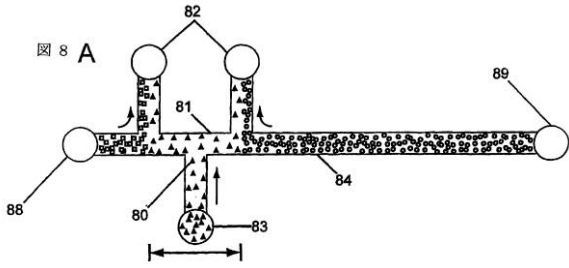
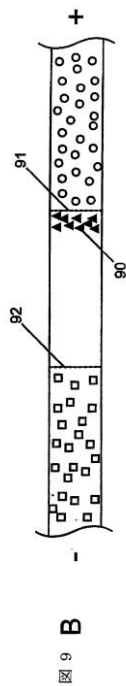
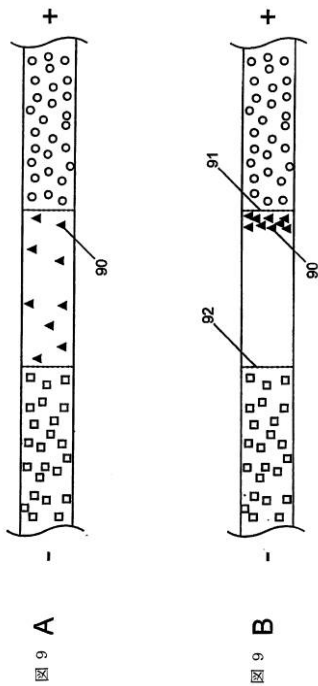


図 7 B

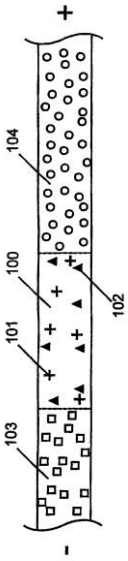
【 図 8 】



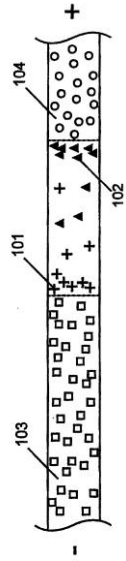
【 図 9 】



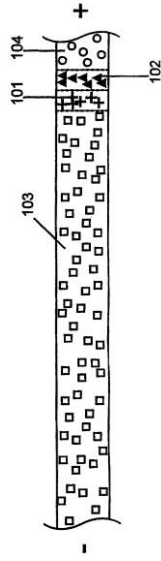
【 10 】



10A

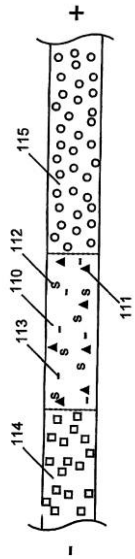


10B

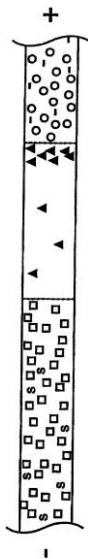


10C

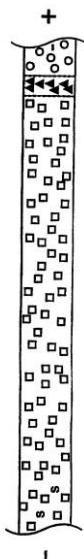
【 11 】



11A



11B



11C



【 図 1 2 】  
図 1 2 A

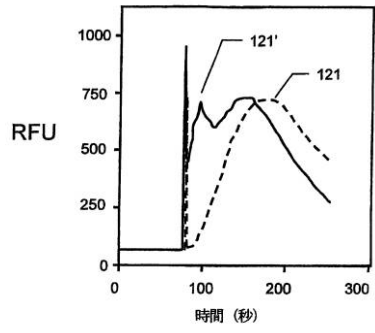
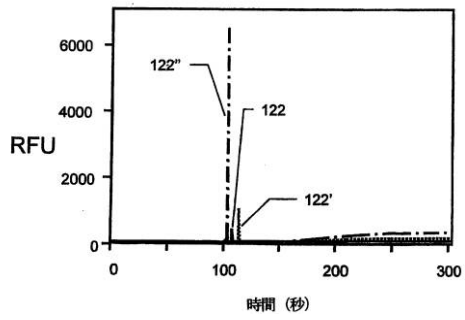


図 1 2 B



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US2004/010914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/561 B01L3/00 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 1 376 126 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 2 January 2004 (2004-01-02)  page 3, lines 14-41; figure 2 page 11, line 11 - page 12, line 31	1-4, 6, 9-22, 24-29, 35-37
X	WO 02/082083 A (KAWABATA TOMOHISA ; NAKAMURA KENJI (JP); SATOMURA SHINJI (JP); WAKO PU) 17 October 2002 (2002-10-17) cited in the application	1-4, 6, 9-22, 24-29, 35-37
Y	the whole document	39, 42, 51, 93
Y	US 6 403 338 B1 (KNAPP MICHAEL ET AL) 11 June 2002 (2002-06-11) column 28, line 45 - column 30, line 30  ----- -/--	39, 42, 93
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
5 October 2004	13/10/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Diez Schlereth, D	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US2004/010914
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 537 433 B1 (BRYNING ZBIGNIEW T ET AL) 25 March 2003 (2003-03-25) column 6, line 4 - column 7, line 3 column 9, line 47 - column 10, line 10 -----	51
Y	WO 03/015901 A (TAN HONG DONG ; KAO HUNG PIN (US); ACLARA BIOSCIENCES INC (US); VREELA) 27 February 2003 (2003-02-27) abstract -----	51
A	US 2002/128234 A1 (HUBBELL JEFFREY A ET AL) 12 September 2002 (2002-09-12) the whole document -----	1-93
A	WO 02/27316 A (ABBOTT LAB) 4 April 2002 (2002-04-04) the whole document -----	1-93

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2004/010914

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1376126	A	02-01-2004	CA 2443320 A1 EP 1376126 A1 US 2004144649 A1 WO 02082083 A1	17-10-2002 02-01-2004 29-07-2004 17-10-2002
WO 02082083	A	17-10-2002	CA 2443320 A1 EP 1376126 A1 WO 02082083 A1 US 2004144649 A1	17-10-2002 02-01-2004 17-10-2002 29-07-2004
US 6403338	B1	11-06-2002	US 6235471 B1 US 2003148922 A1 US 2003087300 A1 US 2003104466 A1 US 6391622 B1 US 6440722 B1 US 6444461 B1 US 6406893 B1 AU 746892 B2 AU 6884198 A CA 2284612 A1 EP 0972082 A1 JP 2001521622 T WO 9845481 A1	22-05-2001 07-08-2003 08-05-2003 05-06-2003 21-05-2002 27-08-2002 03-09-2002 18-06-2002 02-05-2002 30-10-1998 15-10-1998 19-01-2000 06-11-2001 15-10-1998
US 6537433	B1	25-03-2003	AU 4555801 A CA 2402189 A1 EP 1261863 A2 JP 2003527601 T WO 0169230 A2 US 2003057094 A1	24-09-2001 20-09-2001 04-12-2002 16-09-2003 20-09-2001 27-03-2003
WO 03015901	A	27-02-2003	US 2002079223 A1 EP 1453590 A1 WO 03015901 A1 US 2004108207 A1 US 2002189946 A1 US 2004060821 A1	27-06-2002 08-09-2004 27-02-2003 10-06-2004 19-12-2002 01-04-2004
US 2002128234	A1	12-09-2002	AU 769571 B2 AU 4684600 A CA 2371011 A1 EP 1190252 A1 JP 2003516519 T WO 0065352 A1	29-01-2004 10-11-2000 02-11-2000 27-03-2002 13-05-2003 02-11-2000
WO 0227316	A	04-04-2002	CA 2422856 A1 EP 1320753 A2 JP 2004510161 T WO 0227316 A2	04-04-2002 25-06-2003 02-04-2004 04-04-2002

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	G 0 1 N 37/00 1 0 1	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 Q 1/68 A	
	G 0 1 N 33/543 5 0 1 F	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 イリナ・ジー・カザコヴァ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 3 2 ロス ガトス ユニヴァーシティー アヴェニ  
 ユー 9 0 9 ナンバー 1 7

(72) 発明者 三木 豊  
 日本国 6 6 5 - 0 0 7 4 兵庫県宝塚市仁川台 9 6

(72) 発明者 大橋 利成  
 日本国 6 6 1 - 0 9 8 5 兵庫県尼崎市南清水町 2 9 - 2 0 - D

(72) 発明者 フトシ・カンケ  
 アメリカ合衆国 ヴァージニア州 2 3 1 1 4 ミドロズィアン スイフト サークル 1 7 0 9  
 アpartment ナンバー 1 0 3

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QR32 QR35 QR43 QR48 QR62 QR63 QS02  
 QS15 QS16 QS17 QS25 QS31 QX01

专利名称(译)	迁移率变化分析减少干扰		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006524319A</a>	公开(公告)日	2006-10-26
申请号	JP2006501260	申请日	2004-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	加利珀生命科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Caliper Life Sciences公司的油墨. 和光纯薬工业株式会社		
[标]发明人	エイチガレットワダ イリナジーカザコヴァ 三木豊 大橋利成 フトシカンケ		
发明人	エイチ・ガレット・ワダ イリナ・ジー・カザコヴァ 三木 豊 大橋 利成 フトシ・カンケ		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/566 G01N33/543 G01N27/447 G01N37/00 C12Q1/68 B01L3/00 G01N30/02 G01N30/34 G01N30/86 G01N33/53 G01N33/538 G01N33/561		
CPC分类号	G01N30/8644 B01L3/5027 B01L3/502753 B01L2300/0816 B01L2400/0415 B01L2400/0487 G01N30 /02 G01N30/34 G01N33/5306 G01N33/538 G01N33/561		
FI分类号	G01N33/558 G01N33/566.ZNA G01N33/543.521 G01N27/26.331.E G01N27/26.315.K G01N37/00.101 G01N37/00.102 C12Q1/68.A G01N33/543.501.F		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063 /QR62 4B063/QR63 4B063/QS02 4B063/QS15 4B063/QS16 4B063/QS17 4B063/QS25 4B063/QS31 4B063/QX01		
优先权	60/462636 2003-04-14 US 60/500177 2003-09-04 US		
其他公开文献	JP4719669B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于降低非特异性结合的样品成分的干扰，例如在迁移率变动分析的方法和组合物。例如，通过与带电的聚合物结合，如硫酸肝素，以防止干扰由于非特异性样品组分和亲和性物质的结合的组分（例如，亲和分子的缀合物或亲和分子和电荷的载体分子）。本发明还提供了一种浓缩高浓度目标分析物，高灵敏度检测分析物，并进一步优化反应条件以使分析物易于浓缩的方法。本发明的这样的目的是通过例如浓缩分析物和缀合物的复合物来实现的，所述分析物和缀合物通过使样品中的分析物与结合到带电荷的载体分子（例如DNA）上的亲和分子接触而形成。这一点。

